

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Jan Faltejsek

Large macrocycles and their complexes
Velké makrocykly a jejich komplexy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hermann, Dr.

Praha 2020/21

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V dne

.....

Podpis autora

Abstract

Macrocyclic ligands have been used in radiomedicine for a long time. These ligands have been studied mainly in terms of complexation of heavy metal ions and possible use of these complexes in diagnostics and radiotherapy. Recent studies have highlighted the potential use of actinium-225 as an alpha-emitting radionuclide. This isotope is suitable for a precise treatment of micrometastases as it emits a cascade of high-energy but short-range alpha radiation. Due to the high linear energy transfer of the emitted particles, the tumor cells at a given location in the patient's body are completely destroyed. This work deals with the preparation and characterization of 18-membered polyazamacrocyclic ligands that can be used for complexation of this radioisotope. The prepared substances were characterized by potentiometry, NMR, MS and EA. Thermodynamic data of the complexes of these ligands with "model" metal ions (Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+}) were obtained using potentiometry. For cerium(III) complexes of prepared ligands, the pH-dependent kinetics of their formation was studied, and the results of these measurements indicate that these ligands can be used in radiomedicine.

Keywords: macrocyclic ligands, heavy metal complexes, radiotherapy

Abstrakt

Makrocyclické ligandy již dlouho nacházejí své uplatnění v radiomedicině. Jsou studovány zejména z hlediska komplexace iontů těžkých kovů a možného využití těchto komplexů v diagnostice a v radioterapii. Nedávné studie ukázaly na potenciální využití aktinia-225 jakožto radionuklidu emitujícího záření alfa. Tento izotop je vhodný k precizní léčbě mikrometastáz díky tomu, že emituje kaskádu záření alfa o vysoké energii, ale s krátkým doletem. Díky vysokému lineárnímu přenosu energie emitovaných částic dochází ke kompletnímu zničení nádorových buněk v daném místě v těle pacienta. Tato práce se zabývá přípravou a charakterizací 18-členných polyazamakrocyclických ligandů pro možnou komplexaci tohoto radioizotopu. Připravené látky byly charakterizovány pomocí potenciometrie, NMR, MS a EA. Byla získána termodynamická data komplexů těchto ligandů s „modelovými“ ionty kovů (Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+}) pomocí potenciometrie. V případě ceritých komplexů s připravenými ligandy byla studována kinetika jejich vzniku v závislosti na pH. Výsledky těchto měření poukázaly na možnost využití těchto ligandů v radiomedicině.

Klíčová slova: makrocyclické ligandy, komplexy těžkých kovů, radioterapie

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
1 Teoretický úvod	5
1.1 Radionuklidová terapie	5
1.1.1 Radioizotopy v nukleární medicíně	5
1.1.2 Alfa-terapie pomocí ^{225}Ac	7
1.2 Návrh ligandu	10
1.2.1 Koordinační vlastnosti trojmocného aktinia	10
1.2.2 Makrocyclické polyaminokarboxyláty	12
1.2.3 Vliv funkční skupiny	15
1.3 Velké makrocycly	17
1.3.1 18-členné makrocyclické ligandy s alifatickým skeletem	17
1.3.2 Pyridinové polyazamakrocycly	19
2 Cíl práce	23
3 Experimentální část	25
3.1 Obecné informace	25
3.2 Experimentální metody	27
3.2.1 NMR spektroskopie	27
3.2.2 Hmotnostní spektroskopie	27
3.2.3 Elementární analýza	28
3.2.4 Kapalinová chromatografie	28
3.3 Syntéza látky 1	29
3.4 Syntéza látky 2	30
3.4.1 Metoda A (La^{3+})	30
3.4.2 Metoda B (Ba^{2+})	30
3.5 Syntéza látky 3	31
3.6 Syntéza ligandu L ¹	32
3.7 Syntéza ligandu L ²	34
3.8 Syntéza ligandu L ³	35

3.9	Postup a vyhodnocení spektrálními metodami	38
3.9.1	NMR titrace	38
3.9.2	Kinetická měření	38
3.9.3	Potenciometrické titrace	39
4	Výsledky a diskuze	41
4.1	Syntéza ligandů	41
4.1.1	Příprava makrocyklu 3	41
4.1.2	Přípravy ligandů L¹ , L² a L³	42
4.2	Stanovení protonizačních konstant ligandů	46
4.3	Stanovení konstant stability komplexů ligandu L¹ s Ca²⁺ , Sr²⁺ a Ba²⁺	51
4.4	Kinetika komplexace Ce³⁺ s ligandy L¹ a L³	53
5	Závěr	57
	Poděkování	59
	Seznam použité literatury	61

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
aq.	vodný roztok
bezv.	bezvodý
DMP	1,4-dimethylpiperazin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	elementární analýza (<u>E</u> lemental <u>A</u> nalysis)
EXAFS	<u>E</u> xtended <u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>F</u> ine <u>S</u> tructure
ekv.	ekvivalent
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
H ₄ dota	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
H ₄ dotpa	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrapropionová kyselina
H ₄ edta	kyselina ethylendiamintetraoctová
H ₄ heta	1,5,9,13-tetraazacyklohexadekan-1,5,9,13-tetraoctová kyselina
H ₄ teta	1,4,8,11-tetraazacyklododekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
H ₄ tetpa	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrapropionová kyselina
H ₅ pepa	1,4,7,10,13-pentaazacyklopentadekan-1,4,7,10,13-pentaoctová kyselina
H ₆ heha	1,4,7,10,13,16-hexaazacyklooktadekan-1,4,7,10,13,16-hexaoctová kyselina
H ₈ dotp	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis(methylfosfonová) kyselina
H ₁₀ peppa	1,4,7,10,13-pentaazacyklopentadekan-1,4,7,10,13-pentakis(methylfosfonová) kyselina
H ₁₂ hehp	1,4,7,10,13,16-hexaazacyklooktadekan-1,4,7,10,13,16-hexakis(methylfosfonová) kyselina
IgG	imunoglobulin G
K. č.	koordinační číslo
LET	lineární přenos energie (<u>L</u> inear <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer)
MCA	kyselina chloroctová
MS	hmotnostní spektrometrie (<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance (<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance)
např.	například
PSMA	prostatický specifický membránový antigen (<u>P</u> rostate- <u>S</u> pecific <u>M</u> embrane <u>A</u> ntigen)
PVDF	polyvinylidendifluorid
RT	laboratorní teplota (<u>R</u> oom <u>T</u> emperature)
RTG	rentgenové záření
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT	<u>S</u> ingle- <u>P</u> hoton <u>E</u> mission <u>C</u> omputed <u>T</u> omography
TFA	kyselina trifluoroctová
UV	ultrafialová
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná
XANES	<u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>N</u> ear <u>E</u> dge <u>S</u> tructure

Kapitola 1

Teoretický úvod

1.1 Radionuklidová terapie

1.1.1 Radioizotopy v nukleární medicíně

Cílená radionuklidová terapie se již dlouhou dobu těší značného zájmu, jelikož může být aplikována na léčbu chirurgicky nedostupných nádorových onemocnění. Majíce své výhody především v terapeutické účinnosti a specifitě, radioterapie představuje méně poškozující alternativu léčby ve srovnání s jinými metodami. Protinádorová chemoterapie, při které jsou běžně využívány vysoké dávky léčiva, má za následek drastické poškození i jinak zdravých buněk pacienta. Nukleární medicína pracuje s řádově nižším množstvím radiotoxického účinného léčiva, čímž je kolaterální poškození tkáně v důsledku chemotoxicity omezeno. Kromě jiného vykazuje cílená radioterapie značnou efektivitu při léčbě chirurgicky obtížně dostupných nádorů. V současnosti nachází radionuklidová terapie své klinické uplatnění pouze v omezené řadě případů. Většina léčebných procedur pro odstranění nádorových onemocnění je stále reprezentována biologickou léčbou, chemoterapií, častěji využívanou chirurgií nebo kombinací uvedených přístupů [1].

Princip léčby radioterapií spočívá v doručení letální dávky vysokoenergetického záření konkrétně lokalizovaným zhoubným shlukům buněk, metastázám či jiným malformacím. Zdrojem tohoto záření bývá zpravidla radioaktivní izotop kovu, který je spárován s biologicky aktivní molekulou. Tato cílicí molekula může být modifikována tak, aby vykazovala zvýšenou afinitu vůči určité tělní tkáni. Radiofarmakum tedy musí být pro každou léčbu „šito na míru“. Připojením komplexu radionuklidu na biologicky aktivní vektor lze zajistit dopravu radioaktivního radioizotopu do cílené tkáně [2], což vede ke snížení aplikovaných dávek radiofarmaka za současného zlepšení terapeutického efektu. Vzhledem ke skutečnosti, že radioterapeutika tohoto typu jsou nejčastěji podávána intravenózně nebo intrakavitárně a jejich biodistribuce je řízena krevním řečištěm, je nezbytné, aby nedocházelo k interferujícím interakcím připravené látky s tělními látkami a akumulaci radioaktivity ve zdravé tkáni pacienta [1].

Většinu izotopů používaných v klinické radioterapii tvoří zářiče beta. Nejprostudovanějšími izotopy (včetně jejich přípravků) jsou např. lutecium-177 (Lutathera® [3]), yttrium-90 [4], stroncium-89 (Metastron® [5]) nebo samarium-153 (Lexidronam® [6]). Fyzikální parametry některých již zmíněných izotopů emitujících záření beta jsou zachyceny v tabulce (Tab. 1.1).

Tabulka 1.1: Fyzikální parametry nejznámějších zářičů beta používaných pro radioterapii [7].

Izotop		$T_{1/2}/h$	E_{\max}/keV	$l_{\max}/\mu m$	Přímé SPECT zobrazování
Yttrium-90	^{90}Y	64,1	2,284	11 300	Ne
Jód-131	^{131}I	193,0	606	2 300	Ano
Lutecium-177	^{177}Lu	161,0	497	1 800	Ano
Měď-67	^{67}Cu	61,9	575	2 100	Ano
Rhenium-186 ^{1,2}	^{186}Re	90,6	1 077	4 800	Ano
Rhenium-188	^{188}Re	17,0	2 120	10 400	Ano

$T_{1/2}$ = poločas rozpadu uvedeného radioizotopu, E_{\max} = maximální energie emitovaného záření, l_{\max} = maximální dosah emitovaného záření v živé tkáni.

¹ Mimo záření β^- jsou emise radionuklidu ^{186}Re z 7,47 % zastoupeny emisí Augerova elektronu. Ostatní zářiče emitují záření γ a Augerovy elektrony (ϵ) pouze ve stopových množstvích. Brány v potaz jsou pouze přeměny ze základních energetických stavů radionuklidů.

² <https://www.nndc.bnl.gov/nudat2>, verze z 12. 6. 2021.

Jak ukazuje tabulka (Tab. 1.2), zářiče beta disponují nižší energií emitovaného záření a zároveň mají delší dosah než jiné typy záření. Pro léčbu nádorových onemocnění je vzdálenost, kterou může emitovaná částice urazit, a energie, kterou během letu předá, kritickým aspektem. Tato vlastnost je shrnuta v tabulce (Tab. 1.2).

Tabulka 1.2: Porovnání fyzikálních parametrů záření alfa, beta a Augerových elektronů [7].

Emitované záření	$E_{\text{prům}}/keV$	$l_{\text{prům}}/\mu m$	LET (keV/ μm) ¹
α	cca 7000	cca 50	50–230
β^-	cca 1000	cca 5 000	0,2
ϵ	cca 50	cca 20	4–26

$E_{\text{prům}}$ = průměrná maximální energie záření, $l_{\text{prům}}$ = průměrný maximální dosah záření.

¹ Dozimetrická veličina LET popisuje hustotu předávání energie prostředím, kterým prochází ionizující záření.

Ve srovnání se zářiči alfa dosahují emitory negatronového záření a Augerových elektronů nižších hodnot lineárního přenosu energie. Ve shodě s daty uvedenými v tabulkách (Tab. 1.1 a Tab. 1.2) lze dojít k závěru, že zářiče beta mohou radiolyticky působit ve větším rozsahu od svého ukotvení. Tato radiolýza však nemůže být považována za dostatečně účinnou v krátkém

rozsahu, jelikož nedochází k efektivnímu přenosu energie. Na rozdíl od záření beta je záření alfa výrazně tvrdší a znatelně více přispívá k tvorbě volných radikálů a k letálnímu štěpení vláken DNA. Jedna částice alfa dokáže zničit hned několik lidských buněk [8]. Energie emitovaných částic alfa je řádově vyšší než energie chemických vazeb. Přímý průlet částic alfa tělními buňkami vždy způsobí jejich nekrózu. Jelikož dochází ke kompletnímu zničení tkáně vlivem vyšších hodnot LET záření alfa, je riziko opětovného objevení příznaků nemoci omezeno. Při vhodném ukotvení napomáhá krátký dosah záření alfa (40–100 μm) požadovanému ušetření okolní zdravé tkáně, která se nachází mimo předpokládaný dolet emitované částice. Záření beta nachází své uplatnění při léčbě metastáz, zatímco se ze zmíněných důvodů záření alfa jeví jako výhodnější pro léčbu mikrometastáz [9, 10, 11].

1.1.2 Alfa-terapie pomocí ^{225}Ac

Jak již bylo řečeno, záření alfa předkládá vhodnější předpoklady pro radiolytickou léčbu nádorových onemocnění. Přehled nedávno klinicky testovaných emitů alfa a jejich fyzikálních parametrů je uveden v tabulkách (Tab. 1.3 a 1.4). Doposud bylo pro běžné klinické užití schváleno pouze radium-223, a to ve formě RaCl_2 (přípravek Xofigo® [12] 1100 kBq/ml injekční roztok) k léčbě dospělých pacientů s metastatickým kastrocárním rezistentním karcinomem prostaty nebo se symptomatickými metastázami v kostech.

Tabulka 1.3: Přehled klinicky studovaných emitů alfa [11].

Radionuklid	Targetující vektor	Příklad onemocnění	Reference
^{225}Ac	Anti-CD33 IgG	akutní myeloidní leukemie	[13]
^{223}Ra	RaCl_2	kostní, prsní a prostatální metastázy	[14]
^{213}Bi	9.2.27 IgG	Melanom	[15]
^{211}At	Antitenascin IgG	Glioblastoma multiforme	[16]

Optimální poločas rozpadu daného radioizotopu je jednou z nejdůležitějších vlastností radiofarmaceutika. Aktinium-225 (^{225}Ac) se svým poločasem rozpadu cca 10 dní přináší řadu výhod, ale i nevýhod pro své využití. Poločas rozpadu necelých 10 dní je vhodný pro přípravu radiofarmaceutika, *i.e.* komplexaci radioizotopu, separaci účinné látky a podání pacientovi. Tento poločas rovněž umožňuje dostatečnou akumulaci radioterapeutika v cílené tkáni (například s využitím protilátek jako vysokoafinitních konjugčních molekul) a jeho včasné vyloučení, tudíž i zabránění přílišného zatížení těla pacienta radioaktivitou. Potenciál tohoto radioizotopu byl zaznamenán úspěšnou klinickou studií radiofarmaka ^{225}Ac -PSMA-617 při léčbě kastrocárním rezistentního karcinomu prostaty u pacientů, kteří již vyčerpali všechny jiné konvenční možnosti léčby [17]. Nicméně poločas rozpadu tohoto radionuklidu představuje pro pacienta i riziko, a to z farmakokinetických důvodů. Jestliže bude radiofarmakum bez ukotvení a včasného vyloučení kolovat v těle pacienta, bude působit radiotoxickými účinky.

Tabulka 1.4: Fyzikální parametry nejznámějších zářičů alfa užívaných v radioterapii [7].

Izotop	Dceřiný nuklid	$T_{1/2}$	E_{\max}/keV	$l_{\max}/\mu\text{m}$	Emitované záření ¹²
²²⁵ Ac	²²¹ Fr	10 dnů	5 830	48	α (100 %)
		4,9 min	6 341	55	α (99,90 %)
	²¹⁷ At	32 ms	7 069	65	β^- (0,10 %)
					α (99,99 %)
	²¹³ Bi	45,6 min	5 870	48	β^- (0,01 %)
	²¹³ Po	4,2 μs	8 377	85	α (97,80 %)
					α (2,20 %)
					α (100 %)
²¹¹ At		7,2 h	5 867	48	ε (58,20 %)
	²¹¹ Po	516 ms	7 450	70	α (41,80 %)
					α (100 %)
²¹³ Bi		45,6 min	5 870	48	β^- (97,80 %)
	²¹³ Po	4,2 μs	8 377	85	α (2,20 %)
					α (100 %)
²¹² Bi		1,0 h	6 051	51	β^- (64,06 %)
	²¹² Po	0,3 μs	8 785	92	α (35,94 %)
					α (100 %)

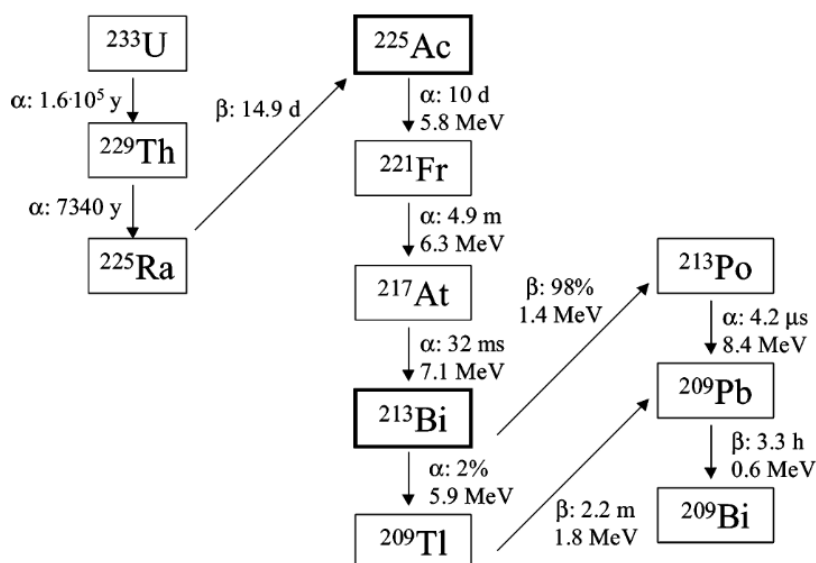
$T_{1/2}$ = poločas rozpadu příslušného radioizotopu, E_{\max} = maximální energie emitovaného záření, l_{\max} = maximální dosah emitovaného záření.

¹ <https://www.nndc.bnl.gov/nudat2>, verze z 12. 6. 2021.

² Není-li uvedeno jinak, jsou emise záření γ a Augerových elektronů (ε) zastoupeny pouze ve stopových množstvích. Brány v potaz jsou pouze přeměny ze základních energetických stavů radionuklidů.

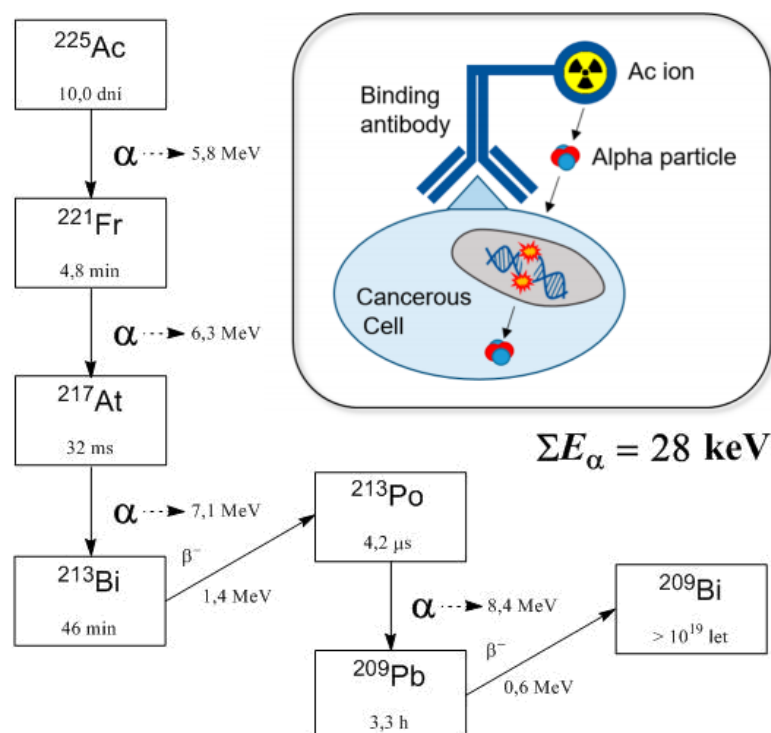
Izotop ²²⁵Ac je součástí rozpadové řady uranu-233 (Obr. 1.1). Je připravován ze směsi radioaktivních nuklidů ²²⁹Th a ²³²Th, což jsou štěpné produkty izotopu ²³³U připravovaného v reaktoru. Izolace radionuklidu ²²⁵Ac je založena na kationtové výměnných a extrakčních chromatografických metodách v prostředí koncentrované HNO₃. Principem této separace jsou rozdílné iontové vlastnosti mateřských a dceřiných nuklidů ²²⁵Ac. Aktinium separované touto cestou může být ihned použito v klinických studiích. Jeho příprava je robustní, rychlá a může být vykonána trénovaným personálem v průběhu 2 až 3 dní. Rovněž lze izolované aktinium využít v radionuklidových generátorech pro přípravu dalšího terapeutického zářiče, kterým je zářič alfa ²¹³Bi [18]. Izotop ²¹³Bi je dceřiným nuklidem radionuklidu ²²⁵Ac v přeměnové řadě (Obr. 1.1).

Izolované aktinium-225 podléhá rychlé následné kaskádě čtyř přeměn alfa a dvou přeměn beta minus (Obr. 1.2). Tato souvislá rozpadová řada je zakončena stabilním a biologicky



Obrázek 1.1: Rozpadová řada radioizotopu ^{233}U – princip přípravy ^{225}Ac a ^{213}Bi (obrázek byl převzat z literatury [18]).

neškodným izotopem ^{209}Bi . Toxicita vzniklých reziduí bismutu-209 je prakticky nulová díky množství použitého ^{225}Ac pro radioterapii. Jestliže aktinium-225 působí jako zdroj záření, je efektivita samotné terapie zesílena návaznou sérií přeměn alfa. Při přeměně na stabilní izotop dochází k vyzáření 4 částic alfa. Výsledná celková energie záření činí 28 MeV na jednu kompletní přeměnu aktinia-225. Nejpodstatnější výhody izotopu ^{225}Ac jako zdroje terapeutického záření jsou, ve srovnání s využívaným izotopem ^{213}Bi (Tab. 1.3), dány jeho cca třistanásobně delším poločasem rozpadu a dodatečnými třemi emisemi energeticky bohatých částic alfa (Obr. 1.2).



Obrázek 1.2: Rozpadová řada radioizotopu ^{225}Ac – jádro emitující několik částic alfa s krátkým doletem a vysokou energií (obrázek byl převzat z literatury [19] a upraven).

1.2 Návrh ligandu

1.2.1 Koordinační vlastnosti trojmocného aktinia

Základní podmínkou pro využití radioaktivního kovu je příprava vhodného hydrofilního nosiče. Komplexy těžkých kovů jsou výrazně méně toxické než jejich volné aqua-ionty. Tudíž umožňují jejich aplikaci *in vivo*. Ligand komplexující částici vyzařující záření alfa musí být bifunkčně modifikovatelný, aby jej bylo možné připojit k biologicky aktivní molekule. Bifunkčnost ligandu je kromě jejich schopnosti komplexovat požadovaný radionuklid dána přítomností konjugační skupiny. Tato skupina slouží ke spojení biologicky aktivní molekuly s komplexem radionuklidu. Konjugační skupiny jsou zpravidla založeny na krátké peptidové sekvenci nebo na jednoduchém uhlovodíkovém řetězci [20]. Jsou-li uvedené podmínky splněny, lze selektivně zacílit cytotoxické účinky záření na lokalizované nádorové buňky (Obr. 1.2).

Aktinium se ve vodném prostředí vyskytuje pouze jako Ac^{3+} ion. Výchozí představou pro navržení struktury ligandu je znalost struktury aqua-iontů, které trojmocné aktinium vytváří. Pomocí metod XANES a EXAFS byly tyto struktury nedávno identifikovány. Struktura aqua-iontu aktinia je tvořena devíti až jedenácti molekulami vody koordinovanými v průměrné

vzdálenosti 2,7 Å od centrálního atomu [21]. Tato skutečnost souhlasí s trendy periodického systému, podle kterého ionty těžkých kovů, lanthanoidů a aktinoidů vytváří komplexy o vyšším koordinačním čísle (dáno především díky velkému poloměru iontu). Štěpení degenerovaných f-orbitalů v krystalovém poli je malé, a tudíž je stabilizace krystalovým/ligandovým polem minoritní. Preference mezi rozdílnými koordinačními čísly a geometriemi jsou explicitně dány velikostí iontu kovu a případnými požadavky ze strany ligandu.

Trojmocné aktinium má chemické vlastnosti podobné trojmocným lanthanoidům. Kation La^{3+} může být považován za vhodnou neradioaktivní náhradu Ac^{3+} v preklinických studiích. Trojmocné aktinium je největším trojmocným iontem v periodické tabulce prvků. Efektivní iontový poloměr pro La^{3+} dosahuje hodnoty 1,03 Å, zatímco pro Ac^{3+} hodnoty 1,12 Å při koordinačním čísle VI (Tab. 1.5). Pro vyšší koordinační čísla trojmocného aktinia nebyly iontové poloměry zatím stanoveny.

Tabulka 1.5: Koordinační parametry vybraných modelových iontů [22].

Ion	K. č.	$R_{\text{ion,ef}}/\text{Å}$	Ion	K. č.	$R_{\text{ion,ef}}/\text{Å}$	Ion	K. č.	$R_{\text{ion,ef}}/\text{Å}$
Ca^{2+}	VI	1,00	Sr^{2+}	VI	1,18	La^{3+}	VI	1,03
	VIII	1,12		VIII	1,26		VIII	1,16
	IX	1,18		IX	1,31		IX	1,22
	X	1,23		X	1,36		X	1,27
Pb^{2+}	VI	1,19	Ba^{2+}	VI	1,35	Ce^{3+}	VI	1,01
	VIII	1,29		VIII	1,42		VIII	1,14
	IX	1,35		IX	1,47		IX	1,20
	X	1,40		X	1,52		X	1,25
Bi^{3+}	VI	1,03	Ra^{2+}	VI	1,48	Ac^{3+}	VI	1,12
	VIII	1,17		VIII	1,70		VIII	?

$R_{\text{ion,ef}}$ = efektivní iontový poloměr iontu při daném koordinačním čísle (k. č.).

Kationty lanthanoidů mají nízkou povrchovou hustotu náboje. Ion Ac^{3+} má díky své velikosti tento parametr ještě nižší, což z Ac^{3+} dělá jeden z nejbazičtějších trojmocných iontů. Hydrolýza této částice probíhá při $\text{pH} > 9$ za vzniku hydroxykomplexů [23]. Nicméně vzhledem ke své slabé polarizovatelnosti je kation Ac^{3+} klasifikován jako „tvrdá“ Lewisova kyselina podle Pearsonovy teorie tvrdých a měkkých kyselin a bází [24]. Ačkoliv je popisovaný ion Ac^{3+} větší než ostatní ionty uvedené v tabulce (Tab. 1.5), díky svému náboji Ac^{3+} preferuje ke koordinaci „tvrdé“ donorové atomy typu O^- (anionty kyslíkatých kyselin) především kvůli elektrostatickým interakcím. „Tvrdé“ Lewisovy kyseliny mají i značnou afinitu k volnému elektronovému páru dusíku v aminových skupinách ligandů.

Koordinační chemie trojmocného aktinia je jednou z velmi málo prozkoumaných oblastí chemie. Ze zřejmých důvodů je práce s aktiniem nákladná a přináší mnohá bezpečnostní úskalí. Před aplikováním navržených ligandů na potenciální koordinaci iontů Ac^{3+} , je nutné

provést pilotní studie jejich komplexů s podobnými, ale neradioaktivními modelovými ionty uvedenými v tabulce (Tab. 1.5).

1.2.2 Makrocyclické polyaminokarboxyláty

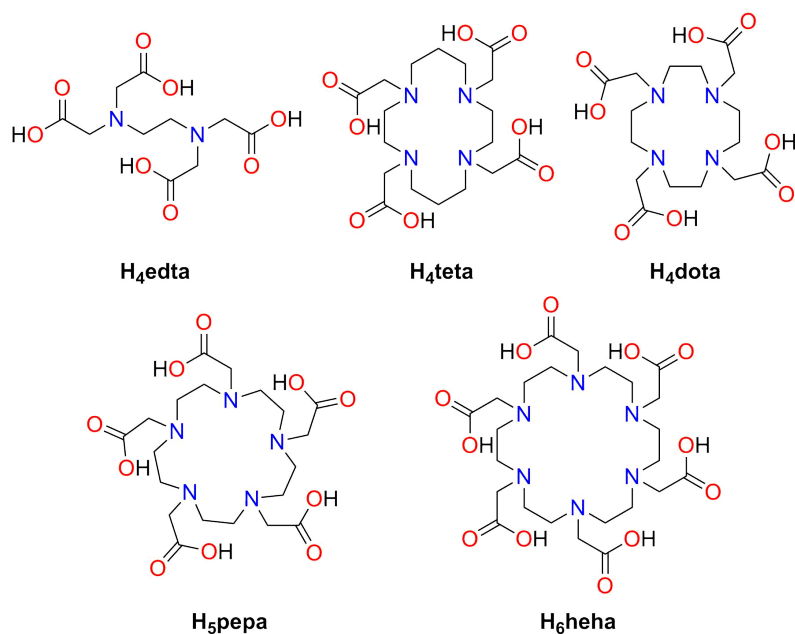
Nestabilita komplexů trojmocného aktinia *in vivo* má dopad na hromadění volného Ac^{3+} v játrech a kostních tkáních. Účinky tohoto hromadění jsou silně akutně radiotoxické [25]. Izolace termodynamicky stabilních a kineticky inertních komplexů je nezbytným požadavkem pro jejich využití v alfa-terapii. Komplex nesmí podléhat degradaci při fyziologických podmínkách. Musí být dostatečně odolný vůči transchelatačním a transmetalacním reakcím, aby nedocházelo k předčasnému uvolnění radionuklidu do zdravé tkáně. Nebezpečí transmetalacních reakcí je především reprezentováno výměnou za ionty Ca^{2+} , transchelatace pak koordinací Ac^{3+} tělními metalofilními proteiny. Nebude-li Ac^{3+} vytvářet dostatečně stabilní komplex, bude přednostně docházet ke srážení iontů Ac^{3+} fosfáty za vzniku nerozpustné soli lokalizované především na kostních tkáních. Rovněž je z hlediska farmakokinetiky komplexu výhodná vyšší hydrofilita, která zvyšuje rychlost vylučování radiofarmaka ledvinami [20].

Stabilita a inertnost komplexu je kromě typu koordinovaných donorových atomů ovlivněna řadou dalších efektů. Největší příspěvek ke stabilitě komplexu přináší chelatační efekt a makrocyclický efekt polydentátního ligandu (vlivem entropického a entalpického příspěvku). Radiofarmaceutika jsou podávána *in vivo* ve velmi malých dávkách. Po zavedení do organismu jsou tyto látky velice zředěné, takže se mohou na molekulární úrovni snadno měnit. Acyklické lineární ligandy sice komplexují radiokovy velmi rychle, ale nevytváří dostatečně inertní komplexy, které by dobře odolávaly transchelataci/transmetalaci (příkladem může být H_4edta).

Nejčastěji jsou k těmto účelům používány polyazamakrocycly, které lze dále modifikovat připojením koordinujících se pendantních ramen na atomy dusíku makrocycly. Díky zápornému náboji acetátových skupin a oběma zmíněným komplexačním efektům vytváří makrocyclické polyaminokarboxyláty s nabitými nuklidy radioaktivních kovů stabilní a inertní komplexy. Přehled některých polyazamakrocyclů s acetátovými pendanty je uveden na obrázku (Obr. 1.3).

Nejprostudovanějším z uvedených makrocyclických ligandů je bezesporu ligand H_4dota (Obr. 1.3). Chelátor H_4dota obsahuje dvanáctičlenný tetraazamakrocyclyklus a čtyři acetátová ramena. Koordinuje se oktaedrálně prostřednictvím čtyř atomů dusíku a čtyř atomů kyslíku. Komplexy tohoto ligandu již našly uplatnění v medicíně právě díky jeho stabilní chelataci trojmocných radionuklidů. Příkladem mohou být komplexy lutecia-177 (např. Lutathera® [3]) a gallia-68 [26].

Nicméně velikost makrocyclické kavity ligandu H_4dota není vhodná ke komplexaci iontů Ac^{3+} . Ionty kovů o vyšším iontovém poloměru vytváří s ligandem H_4dota termodynamicky méně stabilní komplexy. Velký iontový poloměr a koordinační vlastnosti iontů těžkých kovů (jako je Ac^{3+}) destabilizují *in-cage* komplex [27], jelikož centrální atom nelze efektivně umístit do kavity makrocycly [28]. Využití makrocyclického ligandu H_4dota je značně omezeno i po kinetické stránce. Úplné komplexace radionuklidu Ac^{3+} ligandem H_4dota je dosaženo až

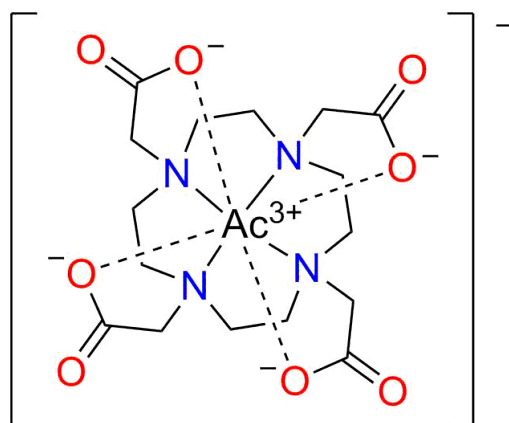


Obrázek 1.3: Přehled makrocyclických polyaminokarboxylátů.

za vysokých teplot ($> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Takové podmínky jsou neslučitelné s využitím protilátek. Systém ligand-kov tedy musí dosahovat vysoké komplexační rychlosti již při mírných teplotních podmínkách. Nevhodnost ligandu H₄dota je rovněž podpořena nízkou kinetickou inertností komplexu s Ac^{3+} . V tomto kontextu byla provedena řada studií, které potvrdily rychlou ztrátu iontu Ac^{3+} z makrocyclické kavity *in vivo* i *in vitro* [29, 30]. Souhrnně tyto nedostatky naznačují, že komplexy ligandu H₄dota s ionty Ac^{3+} (Obr. 1.4), ač jsou používány, nejsou pro radiomedicínu ideální.

V návaznosti na nedostatečnou stabilitu a inertnost komplexů ligandu H₄dota byly studovány další ligandy, které mají podobnou stavbu, ale potenciálně větší rozměr makrocyclické kavity. Ligand H₆heha (18-členný makrocycklus s šesti pendantními karboxylátovými rameny) byl shledán efektivním pro chelataci Ac^{3+} . Velikost makrocyclické kavity a zvýšená denticita ligandu H₆heha teoreticky umožňují vznik termodynamicky stabilnějšího komplexu s Ac^{3+} ve srovnání s ligandem H₄dota. Předpokládaná termodynamická stabilita potenciálního komplexu ligandu H₆heha s Ac^{3+} je založena na vysoké termodynamické stabilitě komplexu ligandu H₆heha s ionty Ln^{3+} (Tab. 1.6).

Selektivita polydentátních ligandů pro velké ionty je dána koordinačními vlastnostmi chelatovaného iontu. Ion Ac^{3+} je dle EXAFS studií jeho aqua komplexu schopen stabilizovat koordinační čísla 10–12 [21, 33]. Dvanáct donorových atomů ligandu H₆heha může zaplnit koordinační sféru Ac^{3+} mnohem efektivněji než osm donorových atomů ligandu H₄dota. Nicméně poslední preklinické studie *in vivo* na myších poukázaly na nízkou kinetickou inertnost a značnou toxicitu tohoto komplexu vlivem dekomplexace radioaktivních dceřiných nuklidů Ac^{3+} [34].



Obrázek 1.4: Komplex ligandu H_4dota s Ac^{3+} . Díky velikosti iontu Ac^{3+} budou pravděpodobně na centrální iont koordinovány 2 až 3 molekuly H_2O , které ve vzorci uvedeny nejsou.

Tabulka 1.6: Porovnání konstant stability ($\log K_{ML}$) komplexů některých trojmocných lanthanoidů s ligandy H_4dota , H_5pepa a H_6heha .

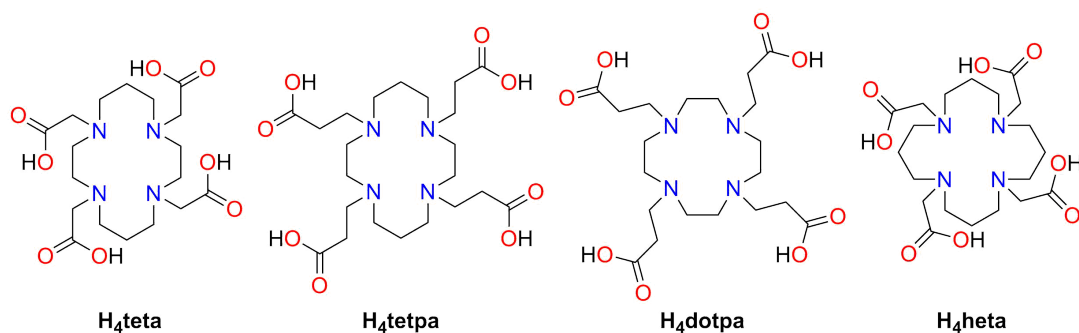
Makrocyklus	Lu^{3+}	Gd^{3+}	Sm^{3+}	La^{3+}	Reference
H_4dota	23,5	23,6	23,3	20,7	[31]
H_5pepa	16,71	15,88	15,35	13,57	[32]
H_6heha	24,26	22,95	21,24	19,11	[32]

Uvedené ionty Ln^{3+} jsou řazeny zprava doleva podle vzrůstající velikosti efektivního iontového poloměru.

Nestabilita studovaných komplexů může být přisuzována výrazné fluxionalitě makrocyclického skeletu větších polyazamakrocyklů. Toxicitu makrocyklu rovněž ovlivňuje celkový náboj komplexu. V případě ligandu H_6heha je celkový náboj komplexu Ac^{3+} při fyziologickém pH roven 3–. Vysoký záporný náboj komplexu je zdrojem nežádoucích silných elektrostatických interakcí s jinými nabitými molekulami a molekulárními systémy organismu.

Mimo ligandy H_4dota a H_6heha byl pro komplexaci Ac^{3+} studován i ligand H_5pepa (Obr. 1.3). Makrocyklus H_5pepa je založen na patnáctičlenném polyazamakrocyklu. Je tvořen 5 terciárními aminy a 5 karboxylátovými pendantními rameny, které vytváří dekadentátní preorganizovanou strukturu ligandu. Ačkoliv je makrocyklus H_5pepa rozměrově mezi ligandy H_4dota a H_6heha , komplexy s ionty Ac^{3+} nebyly stabilní [25]. Tato skutečnost je rovněž pravděpodobně způsobena vysokou fluxionalitou makrocyclického kruhu.

Kromě již uvedených ligandů byly studovány i komplexy ligandů tvořící s centrálním iontem kovu šestičlenné chelátové kruhy. Makrocykly H_4dota , H_6heha i H_5pepa vytváří pětičlenné chelátové kruhy (Obr. 1.4). Komplexy ligandů tvořících pětičlenné chelátové kruhy jsou zpravidla více stabilizovány chelatačním efektem než komplexy ligandů, které vytvoří kruhy



Obrázek 1.5: Přehled makrocyclických polyaminokarboxylátů, které při komplexaci vytváří šestičlenné chelátové kruhy.

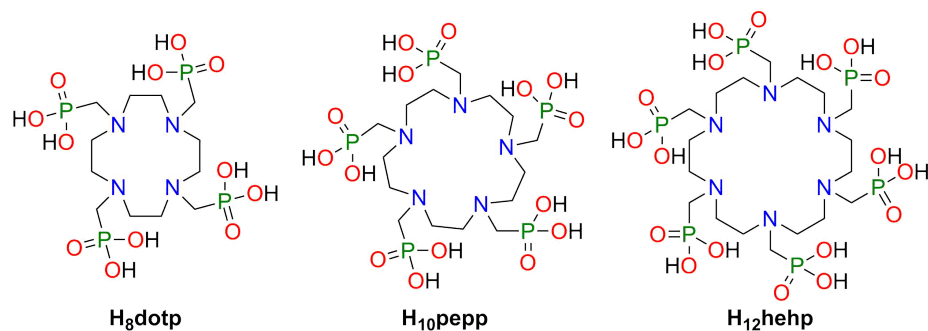
šestičlenné. Důvodem této preference je trend velkých iontů vytvářet více stabilní komplexy s ligandy, které tvoří pětičlenné chelátové kruhy [35]. Důvodem vyšší stability pětičlenných chelátových kruhů je blízká shoda vazebného úhlu s ideálním úhlem $109,5^\circ$ oproti vazebnému úhlu v šestičlenných chelátových kruzích. I přesto jsou ligandy jako H₄teta, H₄tetpa, H₄dotpa nebo H₄heta (Obr. 1.5) nadále studovány pro komplexaci iontů kovů, jelikož chelátový efekt není jediným efektem majícím vliv na termodynamickou stabilitu komplexů. Potenciál ligandů H₄teta, H₄tetpa, H₄dotpa nebo H₄heta tkví v geometrickém zvětšení makrocyclické kavity.

1.2.3 Vliv funkční skupiny

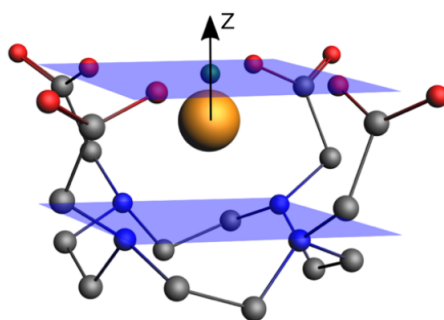
Díky vysoké afinitě velkých, silně nabitých iontů k „tvrdým“ donorovým skupinám byla připravena široká série analogických makrocyclů, které se navzájem liší strukturou pendantních ramen. Kromě makrocyclů s alkoholovými nebo amidovými pendantními rameny existují i makrocyclické ligandy s hydroxamátovými skupinami. Jiným přístupem je využití fosforových analogů karboxylátových skupin, tedy fosfonátových a fosfinátových funkčních skupin.

Jak naznačují předchozí studie, cyklenové deriváty nesoucí čtyři methylenfosfonátová nebo methylenfosfinátová pendantní ramena jsou schopny komplexovat radionuklid $^{213}\text{Bi}^{3+}$ (zářič alfa a dceřiný nuklid ^{225}Ac) *in vitro* zdatně efektivněji a stabilněji než doposud testovaný zlatý standard H₄dota [27, 36]. Experimentálně naměřená data na komplexech s $^{213}\text{Bi}^{3+}$ korelují s výpočetní studií o stabilitě komplexů H₈dotp s Ac^{3+} [37]. Ligand H₈dotp (Obr. 1.6) je teoreticky schopen vázat trojmocné aktinium podstatně silněji než H₄dota [38]. Geometrie komplexů Ac^{3+} s H₈dotp je podobná komplexům s chelátorem H₄dota. Oba komplexy nabývají podobných vazebných délek a úhlů s centrálním atomem. Aby bylo možné rozhodnout, zda jsou pendantní fosfonátová ramena preferována z hlediska stability komplexu pro různé velké makrocyclické skelety, byly spočítány teoretické struktury komplexů Ac^{3+} s ligandy H₁₂hehp a H₁₀pepp (Obr. 1.6) [37]. Přehled vypočítaných vazebných vzdáleností a úhlů a jejich porovnání s acetátovými analogy ligandů těchto komplexů je ukázán v tabulce (Tab. 1.7).

Fosfonátové skupiny jsou více „tvrdé“ než acetátové skupiny, tudíž váží „tvrdé“ trojmocné



Obrázek 1.6: Přehled makrocyclických polyaminofosfonátů, analoga uvedených polyaminkarboxylátů.



Obrázek 1.7: Zachycení rovin O a N ligandu H_4dota uvedených v Tab. 1.7, rovina protínající červené atomy kyslíku je rovina O, rovina protínající modré atomy dusíku je rovina N, centrální ion kovu definuje ortogonální osu Z. Obrázek byl převzat z literatury [37].

lanthanoidy (eventuálně Ac^{3+}) silněji. Ve všech případech (H_8dotp , H_{10}pepp a H_{12}hehp) došlo k prodloužení vazebných délek $\text{Ac}-\text{N}$ a zvětšení vazebných úhlů $\text{O}-\text{Ac}-\text{N}$. Tato skutečnost je částečně vysvětlena tím, že fosforové atomy ve fosfonátových skupinách jsou větší než atomy uhlíku v acetátových pendantních ramenech. Celková velikost 5-členného chelátového kruhu pendantních ramen v případě fosfonátových ramen je zvětšena. V konečném důsledku je předpokládáno stabilnější umístění iontu Ac^{3+} v kavitě ligandů H_8dotp , H_{10}pepp a H_{12}hehp než v případě ligandů H_4dota , H_5pepa a H_6heha . Umístění centrálního atomu v komplexech hraje kritickou roli v termodynamické stabilitě a kinetické inertnosti vzhledem ke sterickým zábranám a dostupnosti iontu transchelatačním reakcím [37].

Ačkoliv jsou fosfonátové skupiny vlivem elektrostatických interakcí schopny silněji přitahovat Ac^{3+} , celkový náboj komplexu by díky velkému počtu těchto skupin dosahoval silně záporných hodnot. Tento fakt je neslučitelný s aplikací *in vivo*. Potenciální řešení tohoto problému může být nalezeno v parciální esterifikaci fosfonátových skupin nebo ve využití fosfinátů jako pendantních ramen.

Tabulka 1.7: Vypočítané průměrné vzdálenosti a vazebné úhly makrocyclických komplexů s Ac^{3+} [37].

Parametr	H ₄ dota	H ₈ dotp	H ₅ pepa	H ₁₀ pepp	H ₆ heha	H ₁₂ hehp
Vzdálenosti [Å]						
Ac–O	2,55	2,51	2,61	2,60	2,57	2,51
Ac–N	2,84	2,92	3,03	3,23	2,88	2,98
O–O ¹	3,42	3,27	2,87	2,90	3,01	3,10
Ac–(rovina O) ²	0,81	0,99	1,00	0,95	1,50	1,32
Ac–(rovina N) ²	1,85	1,96	1,56	1,87	1,14	0,93
(rovina O)–(rovina N) ²	2,66	2,96	2,57	2,82	2,64	2,25
Úhly [°]						
O–Ac–N	61,9	68,0	59,1	62,5	61,9	67,5
O–Ac–N torzní ³	2,66	2,96	2,57	2,82	2,64	2,25

¹ Průměrná vzdálenost mezi sousedními koordinovanými atomy kyslíku.

² Roviny O a N jsou definovány na obrázku (Obr. 1.7).

³ Torzní úhel sevřený iontem Ac^{3+} a atomy dusíku a kyslíku při pohledu podle osy Z (Obr. 1.7).

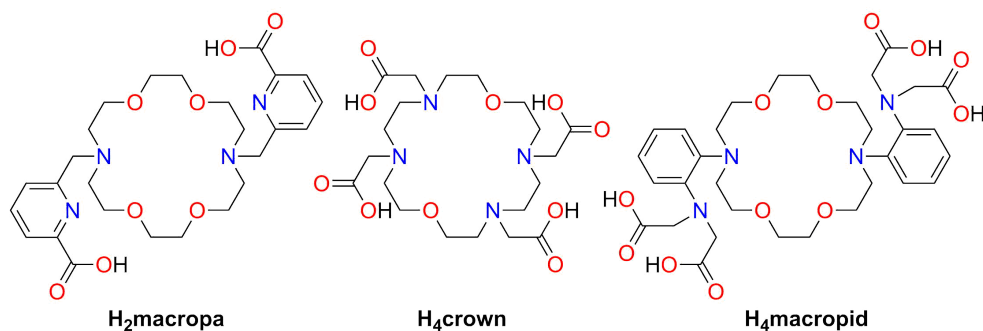
1.3 Velké makrocykly

1.3.1 18-členné makrocyclické ligandy s alifatickým skeletem

Ve snaze vyvinout nové kandidáty pro koordinaci Ac^{3+} byly syntetizovány ligandy H₂macropa, H₄crown a H₄macropid (Obr. 1.8) [39, 40]. Všechny tři uvedené makrocykly jsou 18-členné. Nejprostudovanější z nich – ligand H₂macropa, který je tvořen párem pendentních pikolinátových ramen na atomy dusíku makrocyclického skeletu, byl shledán vhodným pro komplexaci Ac^{3+} . Komplexace $^{225}\text{Ac}^{3+}$ při použití ligandu H₂macropa probíhá kvantitativně již při RT a je z vyšší části dokončena během minut [41]. Oproti tomu je komplexace ligandem H₄dota iniciována až teprve při teplotách vyšších 60 °C. Celkové značení radionuklidem ^{225}Ac není nijak efektivní [29] ve srovnání s lanthanoidy [36].

Jedinečnou vlastností dekadentárního ligandu H₂macropa je schopnost vytvářet stabilní komplexy s velkými dvojmocnými ionty. Tento fenomén podnítil další studie komplexů tohoto makrocyklu. Selektivita pro těžší dvojmocné ionty kovů (zejména pro Sr^{2+} a Ba^{2+}) zabraňuje transmetalacím s lehčími ionty kovů (Ca^{2+}) [42]. Tato vlastnost ligandu H₂macropa může být doložena porovnáním hodnot konstant stability komplexů s jinými makrocykly (Tab. 1.8).

Selektivitu pro velké ionty podporuje nárůst stability komplexů trojmocných iontů lanthanoidů v řadě Lu – La. Trojmocné lutecium má ze skupiny lanthanoidů vlivem lanthanoidové kontrakce nejmenší efektivní iontový poloměr [22]. Konstanta stability komplexu ligandu H₂macropa s Lu^{3+} tudíž dosahuje nejnižší hodnoty (Tab. 1.8). Nicméně hodnoty těchto kon-



Obrázek 1.8: Přehled 18-členných makrocyclických ligandů.

Tabulka 1.8: Porovnání konstant stability ($\log K_{ML}$) komplexů ligandu H₄dota, H₄teta a H₂macropa.

Ion	$R_{ion,X}/\text{\AA}$ [22]	H ₄ dota [43]	H ₄ teta [43]	H ₂ macropa [39, 42]
Ca ²⁺	1,23	17,23	8,32	5,79
Sr ²⁺	1,36	15,22	5,73	9,44
Ba ²⁺	1,52	12,87	3,85	11,11
Lu ³⁺	1,032 ¹	23,5 ²	8,26 ³	8,25
Gd ³⁺	1,107 ¹	23,6 ²	13,77	13,02
La ³⁺	1,27	20,7 ²	11,60	14,99

$R_{ion,X}$ = efektivní iontový poloměr iontu při koordinačním čísle X, šipky znázorňují korelaci v nárůstu hodnot.

¹ Uvedené hodnoty odpovídají koordinačnímu číslu IX.

² Reference [31].

³ Reference [44].

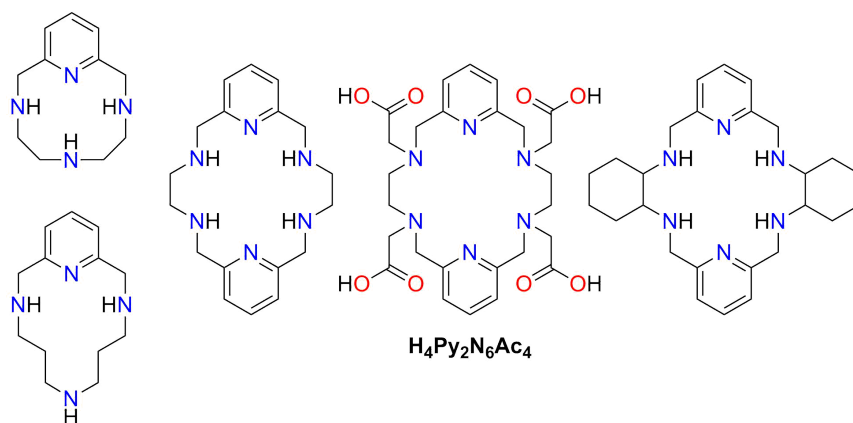
stant pro komplexy ligandu H₂macropa s trojmocnými lanthanoidy jsou o několik řádů nižší než analogické komplexy s ligandem H₄dota. Trojmocné aktinium by teoreticky díky svému velkému rozměru, a tedy nízké povrchové nábojové hustotě, mohlo být dostatečně stabilizováno v makrocyclické kavě ligandu H₂macropa. Doposud není prokázáno, že by komplexy ligandu H₂macropa s Ac³⁺ mohly být považovány za termodynamicky stabilní pro použití *in vivo*. Vlivem vysoké fluxionality makrocyclického skeletu jim rovněž nemůže být přisuzována dostatečná kinetická inertnost, respektive odolnost vůči dekomplexačním reakcím [41].

Celkový kladný náboj komplexu ligandu H₂macropa s Ac³⁺ staví před jeho klinické využití další překážku. Kladné ionty jsou schopny efektivně prostupovat cytoplazmatickou membránou buněk. Vlivem celkového cytosolárního záporného náboje a přítomností různých ionotropních receptorů v povrchové membráně buněk může snáze docházet k akumulaci radionuklidem značeného komplexu (radioterapeutika) ve zdravé tkáni potenciálního pacienta. Pro záporně nabitě částice je toto riziko podstatně nižší.

Kromě ligandu $H_2\text{macropa}$ byly navrženy i jiné ligandy (Obr. 1.8), pro které však k dnešnímu datu chybí potřebná data.

1.3.2 Pyridinové polyazamakrocykly

Kromě 18-členných makrocyklů s alifatickým skeletem jsou známy i makrocykly s pyridinovým kruhem zabudovaným do skeletu makrocyklu [45] (Obr. 1.9). Uvedené makrocyklické ligandy mohou být opět následně modifikovány připojením některých z pestré palety pendantních ramen [46, 47]. Modifikací symetrického dipyridinového 18-členného tetraazamakrocyklu může být připravena látka $H_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$. Tento ligand je díky své struktuře rigidnější než jiné 18-členné makrocykly. Dalšími modifikacemi lze struktura této látky ještě „zpevnit“ (příkladem může být náhrada ethylenových zbytků makrocyklického skeletu za opticky aktivní cyklohexylenové zbytky [48]).

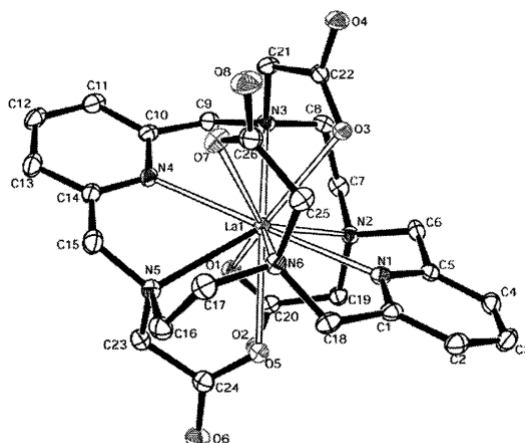


Obrázek 1.9: Polyazamakrocykly s pyridinovým kruhem.

Ligand $H_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$ nabízí kompromis mezi již uvedenými preferencemi, kterých by měl ideální chelátor Ac^{3+} dosahovat. Jedná se o 18-členný makrocyklus se čtyřmi aminovými atomy dusíku, párem pyridinových atomů dusíku a čtyřmi pendantními karboxylátovými rameny schopnými koordinace z obou stran makrocyklického skeletu [49]. Velikost kavity je podobná jako u již popsáných 18-členných makrocyklů. Pyridinové kruhy v makrocyklickém skeletu napomáhají definovat pre-organizovanost makrocyklu zvýšením jeho rigidity. Pyridinové atomy dusíku jsou rovněž dostatečně bazické na to, aby byly schopné koordinace.

V pevné fázi bylo zjištěno, že komplexovaný ion Ln^{3+} je koordinován všemi pendantními rameny. Kation Ln^{3+} je uzavřen do kompaktní struktury, ve které jsou vždy diagonálně protilehlá pendantní ramena koordinována z jedné strany roviny makrocyklického skeletu (Obr. 1.10). Tento trend přestává být platným až při komplexaci Ho^{3+} a menších Ln^{3+} iontů, které jsou již dost malé na to, aby se jedno acetátové rameno na ně nemohlo koordinovat (Obr. 1.11) [49]. Koordinace centrálního atomu pendantními rameny umístěnými nad a pod

rovinou makrocyclu je sice výjimečností tohoto ligandu, ale není pozorována mimořádně. Podobné geometrické rozložení pendantních ramen bylo pozorováno i v komplexech ligandu H₄teta s ionty Zn²⁺ [50]. Analogická geometrie je navržena i v matematickém modelu komplexu ligandu H₆heha s Ac³⁺ [37]. Díky své velikosti by měl být ion Ac³⁺ koordinován ligandem H₄py₂N₄Ac₄ analogickým způsobem jako větší ionty Ln³⁺. Daný způsob koordinace potenciálně vytváří „pevnou schránku“ pro ion Ac³⁺.

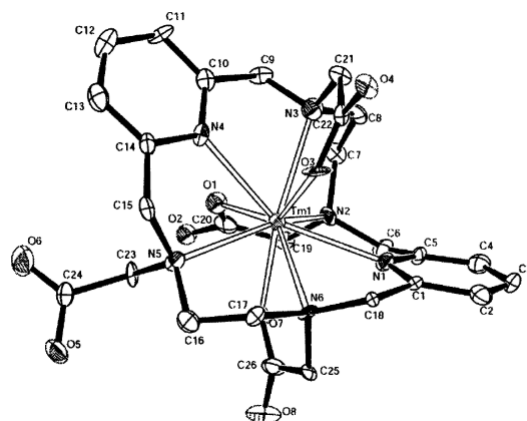


Obrázek 1.10: Analýza struktury v pevné fázi komplexu ligandu H₄py₂N₄Ac₄ a La³⁺. Komplexy jsou izostrukturní pro trojmocné lanthanoidy v řadě La³⁺ až Dy³⁺. Diagonálně protilehlá pendantní ramena jsou koordinována vždy na stejné straně makrocyclického skeletu. Struktura byla převzata z literatury [49].

Ve srovnání s ligandem H₂macropa mají komplexy ligandu H₄py₂N₄Ac₄ s trojmocnými lanthanoidy vyšší konstanty stability (Tab. 1.9). Tato skutečnost může být vysvětlena elektrostatickými interakcemi, které stabilizují trojmocné lanthanoidy uvnitř kavity ligandu H₄py₂N₄Ac₄. Stabilita komplexu je rovněž vyšší díky zvýšené rigiditě makrocyclického skeletu ve srovnání s makrocyclickým skeletem ligandu H₂macropa. Záporný náboj komplexů H₄py₂N₄Ac₄ s Ln³⁺ ve srovnání s kladným nábojem komplexů ligandu H₂macropa s Ln³⁺ rovněž nabízí řadu farmakokinetických výhod, a to zejména z hlediska buněčného transmembránového transportu.

Stanovené konstanty stability komplexů chelátoru H₄py₂N₄Ac₄ dosahují řádově podobných hodnot jako komplexy ligandu H₄dota, a lze je proto považovat za dostatečně termodynamicky stabilní. Nicméně, jak již bylo uvedeno, ligand H₄dota není díky velikosti své kavity úplně vhodný pro chelataci iontů Ac³⁺. Je předpokládáno, že ligand H₄py₂N₄Ac₄ bude vytvářet komplexy s ionty ²²⁵Ac³⁺ o dostatečné termodynamické stabilitě v souvislosti s vysokou stabilitou komplexů tohoto ligandu s Ln³⁺. Rychlost komplexace iontu ²²⁵Ac³⁺ ligandem H₄py₂N₄Ac₄ může být významně ovlivněna jeho pre-organizovaností.

Možnosti použití komplexů Ac³⁺ s chelátorem H₄py₂N₄Ac₄ v radiomedicině jsou dány pře-



Obrázek 1.11: Analýza struktury v pevné fázi komplexu ligandu $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$ a Tm^{3+} . Komplexy jsou izostrukturní pro trojmocné lanthanoidy v řadě Ho^{3+} až Lu^{3+} . Komplex vykazuje podobnost s komplexy větších Ln^{3+} , avšak jedno pendantní rameno není koordinováno. Struktura byla převzata z literatury [49].

Tabulka 1.9: Porovnání konstant stability ($\log K_{\text{ML}}$) komplexů některých trojmocných lanthanoidů s ligandy H_4dota , $\text{H}_2\text{macropa}$ a $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$.

Makrocyclus	Lu^{3+}	Gd^{3+}	Sm^{3+}	La^{3+}	Reference
H_4dota	23,5	23,6	23,3	20,7	[31]
$\text{H}_2\text{macropa}$	8,25	13,02	13,80	14,99	[39]
$\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$	21,7	21,7	22	22,1	[51]

Uvedené ionty Ln^{3+} jsou řazeny zprava doleva podle vzrůstající velikosti efektivního iontového poloměru.

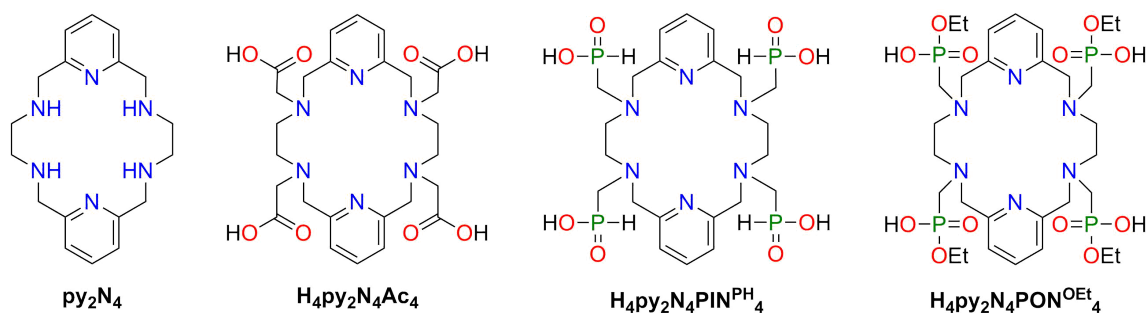
devším rychlostí jejich dekomplexace. Možného zvýšení inertnosti komplexu lze docílit připojením jiných než acetátových pendantních ramen na skelet ligandu $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$. Modifikace monoesterfosfonátovými nebo fosfinátovými pendantními rameny vede ke zvětšení chelátového kruhu pendantních ramen. Jak již bylo popsáno, strukturální pnutí má velký vliv na vlastnosti radiomedicínsky studovaných komplexů, tedy na jejich termodynamickou stabilitu a kinetickou inertnost. Další žádanou vlastností klinicky používaného radioterapeutika je rychlé radionuklidového značení, tedy vysoká rychlost komplexačních reakcí zvoleného iontu. Alternativy ligandu $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$ používající fosforová pendantní ramena (*i.e.* fosfinátová a ethylesterfosfonátová) mohou nabývat žádaných koordinačních vlastností. Současně teoreticky dodržují podmínku záporně nabitého komplexu s ionty Ac^{3+} (komplexy ligandu s neesterifikovanými fosfonátovými rameny nebudou brána v úvahu pro jejich vysoký záporný náboj při fyziologickém pH).

Kapitola 2

Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je připravit 3 makrocyclické ligandy: $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{Ac}_4$, $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{PIN}^{\text{PH}}_4$ a $\text{H}_4\text{py}_2\text{N}_4\text{PON}^{\text{OEt}}_4$, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku (Obr. 2.1). Izolované makrocyclky budou následně podrobeny kinetickým a potenciometrickým studiím za účelem objasnění jejich možného využití v komplexaci velkých kovových iontů. Tyto studie budou provedeny na „modelových“ iontech kovů. Cíl lze tedy rozdělit do následujících bodů:

- Příprava makrocyclu py_2N_4 templátovou syntézou. Následná modifikace aminových dusíků makrocyclu pendantními rameny.
- Stanovení protonizačních konstant připravených makrocyclů. Stanovení konstant stability komplexů těchto ligandů s vybranými ionty kovů.
- Studovat rychlost komplexace uvedených ligandů s ionty Ce^{3+} .



Obrázek 2.1: Makrocyclické ligandy studované v této bakalářské práci.

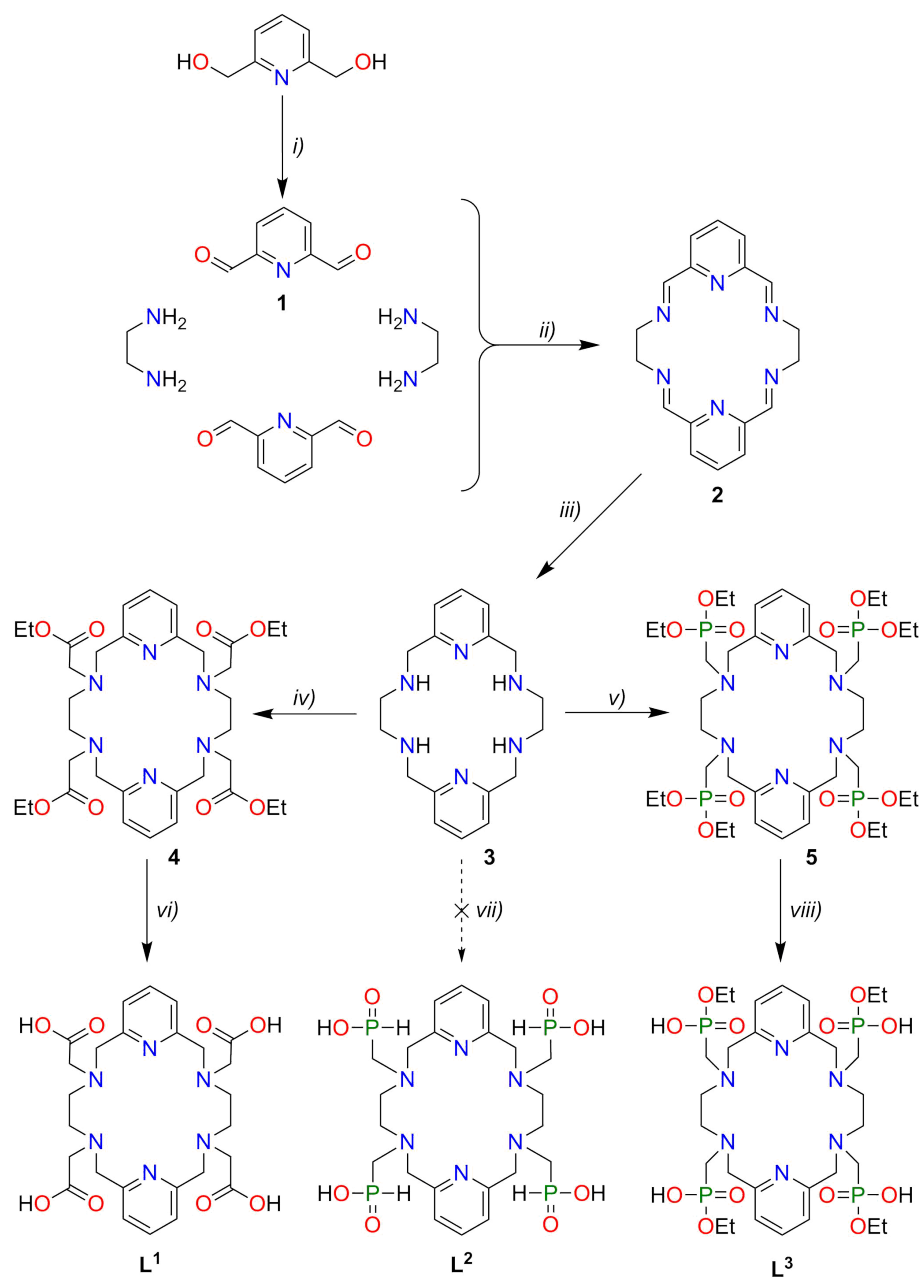
Kapitola 3

Experimentální část

3.1 Obecné informace

Všechny chemikálie byly koupeny od firem Acros, Fluka, Lachema, Sigma Aldrich, Strem Chemicals a byly použity přímo bez dalšího čištění. K čištění reakčních produktů byl používán kationtový iontoměnič Dowex 50 Wx4 v H^+ -cyklu. K zahřívání reakčních směsí byly používány olejové lázně, které byly temperovány duální magnetickou míchačkou a vařičem s termostatem. K míchání směsí byla použita magnetická míchadla potažená teflonem.

Pro syntézu makrocyclů L^1 , L^2 a L^3 byl navržen postup dle schématu (Obr. 3.1). Výchozím prekurzorem pro jejich syntézu je makrocyclus **3**, který byl připraven templátovou syntézou na La^{3+} (metoda A) nebo na Ba^{2+} (metoda B).



Obrázek 3.1: Návrh syntézy makrocyclů L^1 , L^2 a L^3 ; i) $\text{MnO}_2/\text{CHCl}_3$, 75 °C, 6 h ii) metoda A: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2/\text{La}(\text{NO}_3)_3/\text{MeOH}$, 80 °C, 8 h metoda B: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2/\text{BaCl}_2/\text{MeOH}$, 80 °C, 4 h iii) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ (80 %, aq.), 0 °C, 4 h iv) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}/\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{ACN}$, 85 °C, 6 h v) $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{H}/\text{CH}_2\text{O}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}\cdot\text{HBr}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 40 °C, 3 d vi) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, 110 °C, 6 h vii) $\text{H}_3\text{PO}_2/\text{CH}_2\text{O}/\text{EtOH}$, 50 °C, 6 d viii) $\text{Ba}(\text{OH})_2/\text{MeOH}$, 50 °C, 1 d.

3.2 Experimentální metody

3.2.1 NMR spektroskopie

Charakterizační spektra byla měřena na spektrometrech Bruker Avance (III) HD 400 a Varian VNMRs 300. Rezonanční frekvence jednotlivých jader jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3.1). Průběh reakcí byl sledován pomocí Varian VNMRs 300.

Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C v kyvetách (5 mm). Pořízená spektra byla zpracována v programu MestReNova. Hodnoty interakčních konstant J (v Hz) byly odečítány na jedno desetinné místo. Hodnoty chemických posunů (v ppm) byly odečítány na 3 platné cifry.

Tabulka 3.1: Rezonanční frekvence měřených jader.

Měřené jádro	Rezonanční frekvence [MHz]	
	VNMRs 300	Avance (III) HD 400
^1H	299,94	399,94
^{13}C	75,4	100,6
^{31}P	121,4	161,9

Chemické posuny byly referencovány následujícím způsobem:

- ^1H - roztoky v D_2O pomocí vnitřního standardu $t\text{BuOH}$ ($\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm), roztoky v CDCl_3 byly referencovány na zbytkový CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm).
- ^{13}C - roztoky v D_2O pomocí signálu methylových skupin vnitřního standardu $t\text{BuOH}$ ($\delta_{\text{C}} = 30,3$ ppm), roztoky v CDCl_3 byly referencovány na zbytkový CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 77,16$ ppm), v průběhu měření jednotlivých experimentů byl vždy zapnutý širokopásmový decoupling ^1H ($\{^1\text{H}\}$).
- ^{31}P - charakterizační spektra byla naměřena s externí inertní kyvetou obsahující 85% vodný roztok H_3PO_4 ($\delta_{\text{P}} = 0,0$ ppm) nezávisle na použitém rozpouštědle, spektra, při nichž byl sledován průběh reakce, byla naměřena bez reference, v průběhu jednotlivých měření byl zapnutý širokopásmový decoupling ^1H ($\{^1\text{H}\}$), jestliže produkt obsahoval P–H vazbu byl vždy proveden i experiment bez širokopásmového decouplingu ^1H ($\{^1\text{H}\}$).

3.2.2 Hmotnostní spektroskopie

Hmotnostní spektra v pozitivním módu byla pořízena na přístroji Waters ACQUITY QDa (ionizace duálním ortogonálním elektrosprejem pro ionizaci za atmosférického tlaku) s kvadrupolovým analyzátozem s rozsahem 30–1250 m/z . V textu jsou diskutovány pouze takové ionty,

které dosahují vyšších intenzit než např. přirozené pozadí používaného přístroje a zároveň odpovídají zkoumaným molekulám. Látky rozpustné ve vodě byly měřeny v 0,1% vodných roztocích TFA. Látky obtížně rozpustné v protických rozpouštědlech byly měřeny v 0,1% roztocích TFA v ACN. Záznam z hmotnostní spektroskopie je v experimentální části a diskuzní části uváděn podle modelu „naměřená hodnota (*teoretická hodnota*; [fragment])”.

3.2.3 Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku bylo stanoveno na přístroji PE 2400 II. Zastoupení fosforu a chloru bylo stanoveno na přístroji SPECTRO iQ II röntgenovou fluorescenční analýzou. Záznam z elementární analýzy (vždy průměr ze dvou měření) je v syntetické části uveden podle modelu „prvek naměřená hodnota (*teoretická hodnota*)”.

3.2.4 Kapalinová chromatografie

Sloupcová chromatografie za zvýšeného tlaku („Flash” chromatografie) byla provedena na sestavě zařízení Sepacore (Büchi) sestávající z UV spektrometru C-640, kontrolní jednotky C-620, kolektoru frakcí C-660, dvou pump C-605 a čtyř lamp s volitelně nastavitelnými vlnovými délkami emitovaného záření. K dělení látek syntetické části byly využity vlnové délky 200 nm, 210 nm, 254 nm a 264 nm. Hlavním rozhodovacím faktorem pro oddělování frakcí byl záznam vlnové délky 254 nm. Chromatografické kolony (C18 silikagel, Sepacore, rozměr 4,2 × 22 cm, 120 g, Büchi) byly vždy před každým dělením důkladně promyty polárnější z mobilních fází (0,1% vodný roztok HCl). Jednotlivé frakce byly eluovány lineární gradientovou elucí (gradienty v Tab. 3.2) mobilními fázemi 0,1% HCl:ACN a jímány do zkumavek (50 ml).

Tabulka 3.2: Gradienty G1, G2 a G3 pro „flash” chromatografie a gradient H1 pro HPLC.

G1 ¹		G2 ¹		G3 ¹		H1 ²	
<i>t</i> /[min]	ACN/[%]	<i>t</i> /[min]	ACN/[%]	<i>t</i> /[min]	ACN/[%]	<i>t</i> /[min]	ACN/[%]
0–3	0	0–2	0	0–2	0–0	0–2	0–0
3–23	0–100	2–17	0–10	2–17	0–30	2–8	0–100
23–25	100	17–27	10–30	17–32	30–100	8–11	100–100
		27–37	30–100	32–35	100	11–13	100–0
		37–40	100				

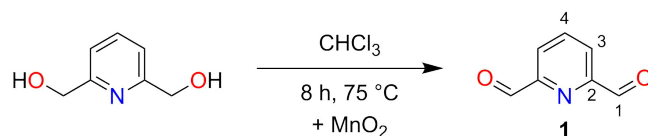
¹ Průtok 45 ml/min a dosažitelný maximální tlak 5 bar.

² Průtok 1,2 ml/min a dosažitelný maximální tlak 655 bar.

Data z analytické vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) sloužila především pro navržení podmínek separace pomocí „flash” chromatografie. HPLC bylo prováděno na přístroji Waters ACQUITY QDa (ionizace duálním ortogonálním elektrosprejem pro ionizaci za

atmosférického tlaku) s kvadrupólovým analyzátozem s rozsahem 30-1250 m/z . Identifikace jednotlivých analytů proběhla pomocí hmotnostní spektroskopie. Vlastní dělení probíhalo na silikagelové koloně CORTECSTM C18 (rozměr 4,6 × 50 mm s průměrem částic 2,7 μm). Mobilní fáze: 0,1% TFA v ACN (Rotisolv, HPLC Gradient grade), 0,1% TFA v deionizované vodě. V experimentální části jsou uváděny retenční časy syntetizovaných látek na této koloně (UV detekce).

3.3 Syntéza látky 1



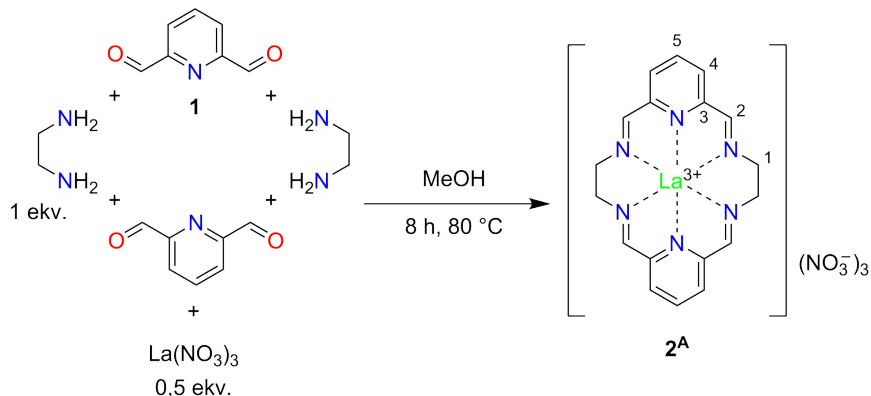
V kulaté baňce (500 ml) byl suspendován výrobcem aktivovaný MnO_2 (30 g) v CHCl_3 (300 ml). Do vzniklé suspenze byl rozpuštěn 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (3,00 g, 22 mmol). Heterogenní směs byla míchána magnetickým míchadlem a refluxována při 75 °C přes noc. Po pomalém ochlazení na RT během 15 minut byla směs přefiltrována přes fritu o zrnitosti S4. Zachycený MnO_2 byl důkladně promyt třemi porcemi Et_2O (3 × 100 ml). Kombinovaný filtrát byl odpařen do sucha na RVO. Byla získána žlutobílá látka ve formě prášku (**1**, 1,70 g, 58 %).

Charakterizace látky **1**:

- **^1H -NMR (CDCl_3):** 8,08 (tt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6 \text{ Hz}$, $^5J_{\text{HH}} = 0,8 \text{ Hz}$, H^4), 8,18 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 0,9 \text{ Hz}$, H^3), 10,2 (d, 2H, $^{4-5}J_{\text{HH}} = 0,8 \text{ Hz}$, H^1)
- **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3):** 126 (C^3), 139 (C^4), 153 (C^2), 193 (C^1)
- **MS(+):** 136,03 (136,04; $[\text{M} + \text{H}]^+$)

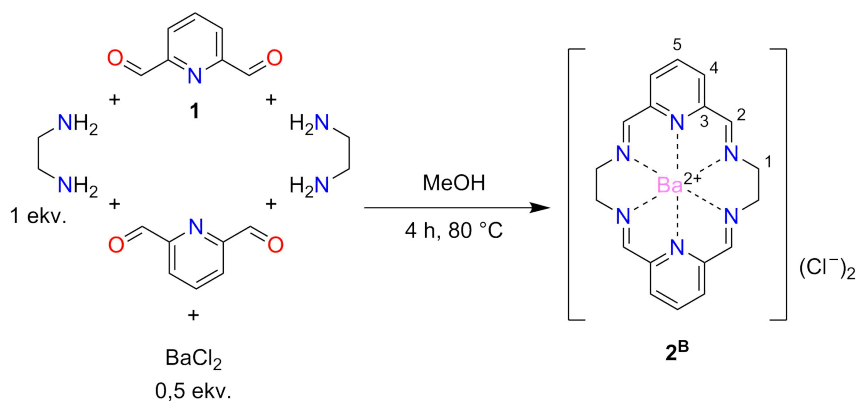
3.4 Syntéza látky 2

3.4.1 Metoda A (La^{3+})



V kulaté baňce (500 ml) byla v MeOH (250 ml) rozpuštěna látka **1** (2,60 g, 19,25 mmol) a $\text{La(NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,17 g, 9,63 mmol, 0,5 ekv.). Za míchání magnetickým míchadlem byl do roztoku pomalu, po částech v průběhu cca 3 minut přidán ethylendiamin (1,29 ml, 1,16 g, 19,25 mmol, 1 ekv.) pomocí injekční stříkačky. Reakční směs byla míchána magnetickým míchadlem a refluxována při 80°C přes noc. Po pomalém ochlazení na RT během 15 minut byla vzniklá suspenze přefiltrována přes fritu S4. Oranžovohnědý produkt byl důkladně promyt třemi porcemi Et_2O (3×100 ml). Byla získána oranžovohnědá látka izolovaná po vysušení jako prášek (**2^A**, 4,40 g, 71 %).

3.4.2 Metoda B (Ba^{2+})



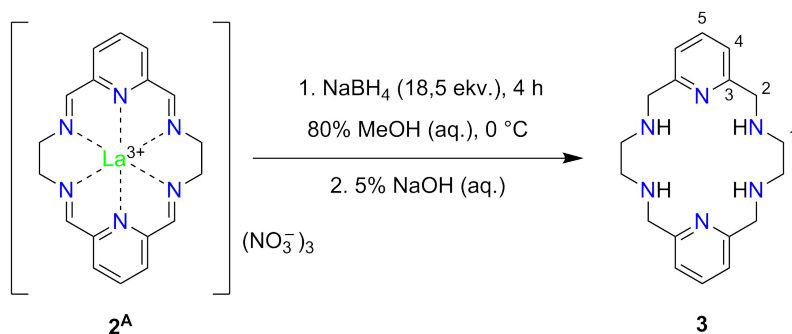
Roztok ethylendiaminu (0,67 ml, 0,60 g, 10 mmol, 1 ekv.) v MeOH (20 ml) byl po dobu 15 minut přikapáván do roztoku (10 mmol) látky **1** a $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,22 g, 5 mmol, 0,5 ekv.) v MeOH (100 ml) míchaného v kulaté baňce (250 ml) magnetickým míchadlem. Reakční směs

byla při teplotě 80 °C olejové lázně refluxována po dobu 4 hodin. Po ukončení reakce byl tmavě žlutý roztok pomalu ochlazen na RT. Látka **2^B** byla vysrážena postupným přidáváním Et₂O (cca 100 ml). Vzniklá sraženina byla odfiltrována na fritě S4 a promyta Et₂O (50 ml). Byla izolována oranžová polykrystalická látka (**2^B**, 1,09 g, 41 %).

Charakterizace látky **2^A** a **2^B**:

- ¹H-NMR [**2^A**] (D₂O, pD = 8, **73** + **0**, **41**): 4,17 (s, 8H, H¹), 8,08 (d, 4H, ³J_{HH} = 7,7 Hz, H⁴), 8,40 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,7 Hz, H⁵), 8,84 (s, 4H, H²)
- ¹³C{¹H}-NMR [**2^A**] (D₂O, pD = 8, **73** + **0**, **41**): 60,2 (C¹), 130 (C⁴), 143 (C⁵), 166 (C²), 170 (C³)
- MS(+)[**2^A**]: 683,14 (683,04; [M + 2CF₃COO]⁺)
- MS(+)[**2^B**]: 683,03 (683,04; [M + 2CF₃COO + H]⁺)

3.5 Syntéza látky **3**

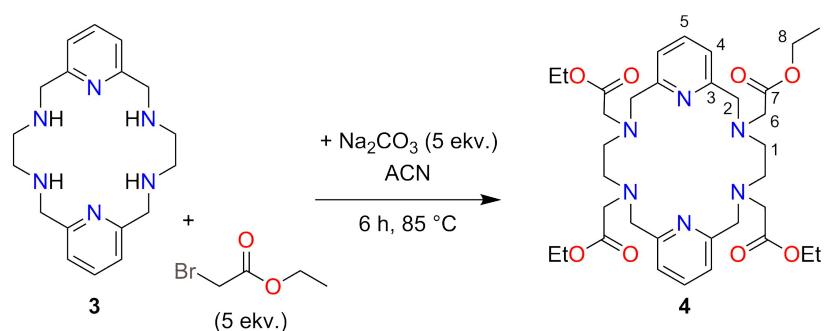


V kulaté baňce (250 ml) byla rozpuštěna látka **2^A** (4,14 g, 6,44 mmol) v 80% roztoku MeOH (aq., 200 ml). Baňka byla umístěna do ledové lázně a za míchání byl do reakční směsi po částech během cca 5 minut přidán NaBH₄ (3,00 g, 79,30 mmol, 12 ekv.). Po cca 30 minutách byl do reakční směsi po částech během cca 3 minut přidán další NaBH₄ (1,60 g, 42,29 mmol, 6,5 ekv.). Baňka byla uzavřena zábrusovou trubičkou pro odvod vznikajícího plynu. Směs byla ponechána reagovat po dobu 4 hodin. Následně byla reakční směs přefiltrována na fritě S4. Filtrát byl odpařen do sucha na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 5% roztoku NaOH (aq., cca 250 ml) a bílá sraženina byla odstraněna filtrací přes fritu o zrnitosti S4. Bezbarvý filtrát byl v dělicí nálevce (500 ml) extrahován z bazické vody pomocí CHCl₃ (100 ml). Extrakce pomocí CHCl₃ byla provedena celkem čtyřikrát. Po vysušení kombinované organické fáze pomocí bezvodého Na₂SO₄ a filtrací sušidla byl filtrát odpařen na RVO. Intermediát **3**·3H₂O byl získán ve formě nažloutlé, amorfni pevné látky (1,79 g, 86 %).

Charakterizace látky **3**:

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2,66 (bs, 4H, H^{N}), 2,81 (s, 8H, H^1), 3,86 (s, 8H, H^2), 7,03 (d, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6 \text{ Hz}$, H^4), 7,52 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6 \text{ Hz}$, H^5)
- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CDCl_3): 49,1 (C^1), 54,8 (C^2), 121 (C^4), 137 (C^5), 159 (C^3)
- $\text{MS}(+)$: 327,25 (327,23; $[\text{M} + \text{H}]^+$), 349,26 (349,21; $[\text{M} + \text{Na}]^+$)
- $\text{EA}(3 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$: C 56,47 (56,82), H 8,30 (8,48), N 20,95 (22,09)

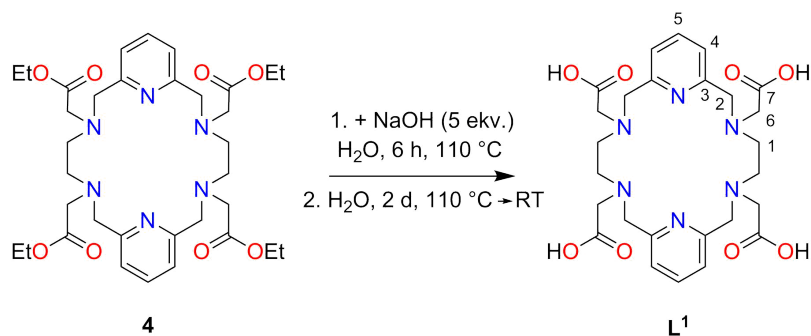
3.6 Syntéza ligandu L^1



V kulaté baňce (500 ml) byl připraven roztok látky $3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,14 g, 3,00 mmol) v ACN (200 ml). Do roztoku byla převedena navážka bezvodého Na_2CO_3 (2,54 g, 24,00 mmol, 8 ekv.) za vzniku suspenze. V průběhu 15 minut byl do směsi po kapkách přidán roztok ethylbromoacetátu (2,65 ml, 24,00 mmol, 8 ekv.) v ACN (50 ml). Za stálého míchání magnetickým míchadlem byl roztok refluxován po dobu 6 hodin při teplotě lázně 85°C . Po pomalém ochlazení na RT během 15 minut byla směs přefiltrována přes fritu o zrnitosti S4. Filtrát byl následně odpařen do sucha na RVO. Odparek byl rozpuštěn do CHCl_3 (cca 200 ml) a kvantitativně převeden do dělicí nálevky (500 ml). Roztok byl čtyřikrát důkladně promyt H_2O ($4 \times 100 \text{ ml}$). Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 , zfiltrována a následně odpařena na RVO do sucha. Byl získán žlutý olej obsahující látku **4**. Surový produkt ve formě oleje byl rozpuštěn v *i*PrOH (20 ml). Roztok byl přefiltrován přes stříkačkový PVDF filtr ($0,22 \mu\text{m}$) a následně byl přečištěn na „flash“ chromatografii (silikagel, rozměr $4,2 \times 15 \text{ cm}$, 80 g, mobilní fáze *i*PrOH:MeOH 20:1). Frakce obsahující čistý produkt byly tmavě žluté (identifikováno pomocí MS) a následně zakoncentrovány *in vacuo* na RVO. Po odpaření spojených frakcí obsahujících čistý produkt zbyl v baňce žlutý olej, jenž po cca 5 dnech při RT ztuhl. Byla získána žlutobílá pevná látka (**4**, 1,53 g, 84 %).

Charakterizace látky 4:

- **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** 1,12 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7,1$ Hz, H^9), 2,83 (s, 8H, H^1), 3,15 (s, 8H, H^6), 3,91 (q, 8H, $^3J_{\text{HH}} = 6,7$ Hz, H^8), 3,95 (s, 8H, H^2), 7,17 (d, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, H^4), 7,62 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, H^5)
- **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CDCl_3):** 14,1 (C^9), 52,5 (C^1), 56,0 (C^6), 57,4 (C^2), 60,8 (C^8), 123 (C^4), 138 (C^5), 158 (C^3), 172 (C^7)
- **MS(+):** 671,55 (671,38; $[\text{M} + \text{H}]^+$), 693,51 (693,36; $[\text{M} + \text{Na}]^+$)

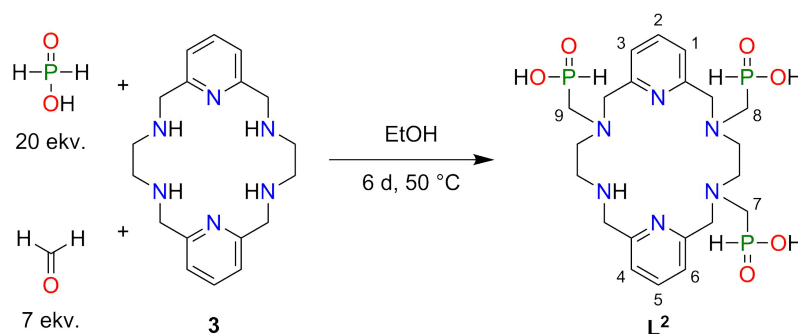


Látka 4 (1,53 g, 2,28 mmol) byla rozpuštěna v kulaté baňce (250 ml) v H_2O (cca 150 ml). Do baňky byla převedena navážka NaOH (0,46 g, 11,50 mmol, 5 ekv.). Vzniklý roztok byl za míchání refluxován při teplotě $110\text{ } ^\circ\text{C}$ po dobu 6 hodin. Po pomalém ochlazení byl roztok míchán při RT po dobu 48 hodin. Do směsi byl postupně přidán 10% roztok HCl (aq.) do cca pH 3 (kontrola pomocí pH papírku). Reakční směs byla následně zakoncentrována *in vacuo*. Odparek byl rozpuštěn v EtOH (cca 100 ml) a přefiltrován přes fritu S4. Filtrát byl odpařen na RVO. Surový produkt ve formě žlutobílého prášku byl rozpuštěn v H_2O (15 ml). Roztok byl přefiltrován přes stříkačkový PVDF filtr (0,22 μm) a čištěn „flash“ chromatografií (C18 silikagel, 120g, mobilní fáze 0,1% HCl:ACN, gradient G1 v Tab. 3.2). Frakce obsahující čistou látku L^1 byly tmavě žluté (identifikováno pomocí MS). Spojené frakce byly zakoncentrovány *in vacuo*. Odparek byl rozpuštěn v MeOH (50 ml) a produkt byl vysrážen přidáním acetonu (150 ml). Po chvíli trituratione prášku v ultrazvuku (5 min) byla pevná látka odfiltrována na fritě S4. Pevná látka byla sušena dispergováním v Et_2O (10 ml), znovu odfiltrována na fritě S4 a sušena prosáváním vzduchu po dobu cca 5 minut. Byla izolována bílá pevná látka ($\text{L}^1 \cdot \text{HBr} \cdot 3 \text{HCl} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1,27 g, 68 %) ve formě prášku.

Charakterizace látky **L**¹:

- ¹H-NMR (**D**₂**O**, pD = 5, **52** + **0**, **41**): 3,52 (s, 8H, H¹), 3,53 (s, 8H, H⁶), 4,48 (s, 8H, H²), 7,60 (d, 4H, ³J_{HH} = 7,8 Hz, H⁴), 8,10 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,8 Hz, H⁵)
- ¹³C{¹H}-NMR (**D**₂**O**, pD = 5, **52** + **0**, **41**): 51,9 (C¹), 56,9 (C⁶), 58,1 (C²), 126 (C⁴), 142 (C⁵), 152 (C³), 174 (C⁷)
- MS(+): 559,22 (559,25; [M + H]⁺), 581,22 (581,23; [M + Na]⁺)
- EA(**L**¹·**HBr**·**3 HCl**·**4 H**₂**O**): C 38,67 (38,04), H 4,61 (5,65), N 10,19 (10,24), Cl 12,3 (12,95)
- HPLC: *t* = 0, 50 min (gradient H1 v Tab. 3.2)

3.7 Syntéza ligandu **L**²



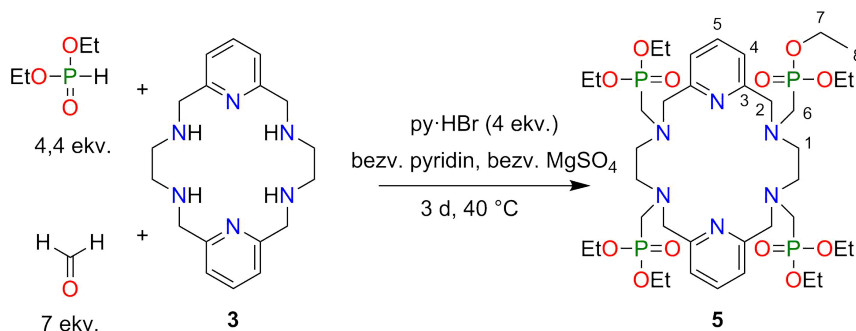
V kulaté baňce (100 ml) byl rozpuštěn prekurzor **3**·**3 H**₂**O** (0,95 g, 2,50 mmol) a paraformaldehyd (0,53 g, 17,50 mmol, 7 ekv.) v EtOH (cca 50 ml). Do roztoku byl pomocí injekce postupně přikapán 50% vodný roztok H₃PO₄ (5,4 ml, 6,60 g, 50,00 mmol, 20 ekv.). Reakční směs byla dolita EtOH až téměř po zábrus. Reakční směs byla míchána při teplotě olejové lázně 40 °C po dobu 1 dne. Konverze látky **3**·**3 H**₂**O** na látku **L**² dosahovala pouze 5 % (podle ³¹P-NMR). Z tohoto důvodu byla teplota olejové lázně nastavena na 50 °C. Po 2 dnech vzrostla konverze látky **3**·**3 H**₂**O** na látku **L**² na 20 % (s 20 % přítomností H₃PO₃ vůči počátečnímu množství H₃PO₄ podle ³¹P-NMR). Do reakční směsi byl přidán paraformaldehyd (0,53 g, 17,50 mmol, 7 ekv.). Po dalších 2 dnech při zahřívání olejové lázně na 50 °C dosáhla konverze látky **3**·**3 H**₂**O** na látku **L**² 50 %, která již zůstala na další den nezměněná. Reakční směs byla zbavena nezreagovaného paraformaldehydu filtrací na fritě S4. Filtrát byl zahustěn na RVO a surový produkt ve formě oleje byl nanesen na kolonu Dowex 50 Wx4 (100 ml). Kolona byla promyta vodou (cca 150 ml). Produkt byl z iontoměniče eluován 50% vodným roztokem pyridinu. Eluát byl zakoncentrován *in vacuo*. Odparek ve formě nažloutlého oleje byl rozpuštěn v H₂O (10 ml). Vzniklý roztok byl přefiltrován přes PVDF filtr (0,22 μm) a čištěn „flash“ chromatografií (C18 silikagel, 120g, mobilní fáze 0,1% HCl:ACN, gradient G2 v Tab. 3.2). Frakce obsahující látku **L**² byly bezbarvé

(identifikováno pomocí MS). Spojené frakce obsahující čistý produkt byly odpařeny na RVO. Odparek ve formě bezbarvého oleje byl v kulaté baňce (500 ml) rozpuštěn v H₂O (cca 200 ml). Látka **L²** byla lyofilizována z vody. Byl připraven ligand **L²·2,5 HCl·5 H₂O** (0,58 g, 31 %) ve formě bezbarvého lyofilizátu.

Charakterizace látky **L²**:

- **¹H-NMR (D₂O, pD = 6,03 + 0,41):** 2,70 (dd, 6H, ²J_{HP} = 61,6 Hz, ³J_{HH} = 9,2 Hz, H⁷, H⁸, H⁹), 3,11–3,45 (bm, 10H), 3,65 (dd, 3H, ¹J_{HP} = 549,9 Hz, ³J_{HH} = 9,2 Hz, H^P), 4,04 (bs, 2H), 7,41–7,54 (bm, 4H, H¹, H³, H⁴, H⁶), 7,97 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,8 Hz, H², H⁵)
- **¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 6,03 + 0,41):** 45,7–60,4 (m, 11C), 140–158 (m, 10C)
- **³¹P-NMR (D₂O, pD = 12,83 + 0,41):** 23,5 (dt, ¹J_{PH} = 509 Hz, ²J_{PH} = 9,8 Hz, 1P), 23,7 (dt, ¹J_{PH} = 509 Hz, ²J_{PH} = 9,8 Hz, 1P), 23,8 (dt, ¹J_{PH} = 508 Hz, ²J_{PH} = 9,8 Hz, 1P)
- **³¹P{¹H}-NMR (D₂O, pD = 12,83 + 0,41):** 23,5 (s, 1P), 23,7 (s, 1P), 23,8 (s, 1P)
- **MS(+):** 561,18 (561,19; [M + H]⁺)
- **EA(L²·2,5 HCl·5 H₂O):** C 33,92 (34,15), H 5,96 (6,07), N 11,05 (11,38), P 12,1 (12,58), Cl 11,9 (12,00)
- **HPLC:** *t* = 0,88 min (gradient H1 v Tab. 3.2)

3.8 Syntéza ligandu **L³**

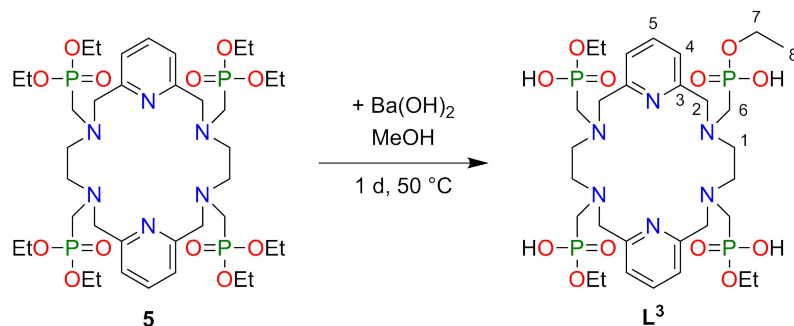


V kulaté baňce (100 ml) byly v bezvodém pyridinu (cca 50 ml) dispergovány navážky **3**·3 H₂O (0,95 g, 2,50 mmol), pyridinium hydrobromidu (1,61 g, 10,00 mmol, 4 ekv.) a para-formaldehydu (0,53 g, 17,50 mmol, 7 ekv.). Do suspenze byl přidán diethylfosfit (1,5 ml, 1,55 g, 11,25 mmol, 4,5 ekv.) a bezvodý MgSO₄ (0,50 g). Reakční směs byla dolita bezvodým pyridinem až téměř po zábrus. Suspenze byla za míchání zahřívána na 40 °C. Po uplynutí 1 dne dosahovala konverze látky **3**·3 H₂O na látku **5** 40 % podle ³¹P-NMR (s 10% nedoreagovaného meziproduktu

látky **5**). Do reakční směsi byl přidán paraformaldehyd (0,30 g, 10,00 mmol, 4 ekv.) a diethylfosfit (0,8 ml, 0,86 g, 6,25 mmol, 2,5 ekv.). V následujících 2 dnech byla pravidelně monitorována konverze reakce (pomocí ^{31}P -NMR), která se ustálila na 60 %. Reakční směs byla zbavena nereagovaného paraformaldehydu a sušidla filtrací na fritě S4. Filtrát byl zahuštěn *in vacuo* a surový produkt ve formě oleje byl odpařen s toluenem na RVO. Odparek rozpuštěný v CHCl_3 (150 ml) byl kvantitativně převeden do dělicí nálevky (250 ml). Chloroformová fáze byla čtyřikrát důkladně promyta H_2O (4×50 ml). Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 , zfiltrována a následně odpařena na RVO. Zakoncentrovaný viskózní hnědý olej byl nanesen na kolonu Dowex 50 Wx4 (100 ml). Kolona byla promyta EtOH (cca 100 ml) a látka **5** byla eluována směsí *i*PrOH: NH_3 4:1. Eluát byl zakoncentrován *in vacuo*. Byla připravena látka **5** (1,37 g, 59 %) ve formě hnědočerveného oleje.

Charakterizace látky **5**:

- ^1H -NMR (CDCl_3): 1,32 (t, 24H, $^3J_{\text{HH}} = 7,1$ Hz, H^8), 2,72 (s, 8H, H^1), 3,03 (d, 8H, $^2J_{\text{HP}} = 10,3$ Hz, H^6), 3,21 (s, 8H, H^2), 4,15 (p, 16H, $^3J_{\text{HH}} \sim ^3J_{\text{HP}} = 7,2$ Hz, H^7), 7,50 (d, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, H^4), 7,74 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, H^5)
- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3): 17,0 (C^8), 46,6 (d, $^1J_{\text{CP}} = 134$ Hz, C^6), 52,8 (C^1), 58,3 (C^2), 62,8 (C^7), 122 (C^4), 148 (C^5), 170 (C^3)
- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3): 24,0 (s)
- MS(+): 927,52 (927,41; $[\text{M} + \text{H}]^+$), 949,55 (949,39; $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 965,56 (965,36; $[\text{M} + \text{K}]^+$)



V kulaté baňce (500 ml) byla látka **5** (1,37 g, 1,48 mmol) rozpuštěna v nasyceném roztoku Ba(OH)_2 v MeOH (250 ml), jenž byl připraven filtrací nadbytečného $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ a BaCO_3 z přesyceného roztoku při RT. Reakční směs byla za míchání zahřívána na 50 °C po dobu 1 dne. Zfiltrovaná reakční směs (S4) byla zakoncentrována na RVO a nanesena na Dowex 50 Wx4 (100 ml). Kolona byla dvakrát promyta H_2O ($2 \times$ cca 75 ml). Produkt L^3 byl eluován 50% vodným roztokem pyridinu. Eluát byl zakoncentrován *in vacuo* do formy tmavě žlutého oleje, který byl rozpuštěn v H_2O (cca 10 ml). Připravený roztok byl přefiltrován přes stříkačkový PVDF filtr (0,22 μm). Látka L^3 byla oddělena od organických nečistot a rozpouštědel „flash“

chromatografií (C18 silikagel, 120g, mobilní fáze 0,1% HCl:ACN, gradient G3 v Tab. 3.2). Frakce obsahující čistý produkt měly žlutou barvu. Tyto frakce byly spojeny a odpařeny RVO. Izolovaný žlutý olej byl dispergován ve směsi MeOH (20 ml) a acetonu (80 ml). Po přidání Et₂O (cca 100 ml) byla suspenze triturována pomocí ultrazvuku po dobu 3 min. Látka **L³** ve formě oleje byla zbavena organických rozpouštědel *in vacuo*. Odparek byl v kulaté baňce (500 ml) rozpuštěn v H₂O (cca 200 ml) a vzniklý roztok byl lyofilizován. Lyofilizací ligandu **L³** z vody byla připravena žlutá pevná látka (**L³·2,5 HCl·3 H₂O**, 0,95 g, 67 %).

Charakterizace látky **L³**:

- **¹H-NMR (D₂O, pD = 0,72 + 0,41):** 1,13 (t, 12H, ³J_{HH} = 6,8 Hz, H⁸), 3,44 (d, 8H, J_{H/} = 6,2 Hz, H⁶), 3,85 (p, 8H, ³J_{HH} ~ ³J_{HP} = 7,2 Hz, H⁷), 4,13 (s, 8H, H¹), 4,82 (s, 8H, H²), 7,69 (d, 4H, ³J_{HH} = 6,7 Hz, H⁴), 8,16 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,7 Hz, H⁵)
- **¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 0,72 + 0,41):** 16,6 (C⁸), 48,9 (d, ¹J_{CP} = 131,9 Hz, C⁶), 52,5 (C¹), 60,4 (C²), 62,8 (C⁷), 125 (C⁴), 142 (C⁵), 150 (C³)
- **³¹P{¹H}-NMR (D₂O, pD = 0,72 + 0,41):** 11,8 (s)
- **MS(+):** 815,38 (815,28; [M + H]⁺), 837,42 (837,26; [M + Na]⁺)
- **EA(L³·2,5 HCl·3 H₂O):** C 38,29 (37,54), H 6,15 (6,56), N 8,76 (8,76), P 11,4 (12,91), Cl 9,6 (9,23)
- **HPLC:** *t* = 3,6 min (gradient H1 v Tab. 3.2)

3.9 Postup a vyhodnocení spektrálními metodami

3.9.1 NMR titrace

Závislosti chemických posunů signálů ^1H (δ_{H}) na pH byly naměřeny na spektrometru Varian VNMRs 300 při teplotě 25 °C. Jednotlivé ligandy byly rozpuštěny v H_2O za vzniku roztoků o koncentraci cca 50 mM. Mezi jednotlivými NMR experimenty bylo pH v rozmezí 1–13 upravováno pomocí vodných roztoků LiOH (cca 1,5% a 3%), CsOH (cca 2,0%) a HCl (cca 1,5% a 3%).

Pro obě provedené titrace byl využit následující postup: Na čerstvě nakalibrované (pufry o pH 7,00 a 4,01) elektrodě H-pH-1 bylo pH metrem Jenway 3505 změřeno pH připraveného roztoku v 5-mm kyvetě. Po změření ^1H -NMR experimentu s externí inzerční kyvetou obsahující 0,1% *t*BuOH v D_2O bylo upraveno pH pomocí uvedených roztoků a postup byl opakován. V případě látky zahrnující jádra fosforu byla po změření ^1H -NMR experimentu inzerční kyveta vyměněna za kyvetu obsahující 85% vodný roztok H_3PO_4 ($\delta = 0,0$ ppm). Byl proveden experiment ^{31}P -NMR (bez změny nastavení „locku“ a NMR parametrů „shimu“), jenž byl referencován na standard. Po úpravě pH byla již další spektra měřena pouze s inzertem obsahující 0,1% *t*BuOH v D_2O se zachováním parametrů NMR měření.

Jednotlivé roztoky ligandů byly vždy nejprve upraveny na hodnotu kyselého pH a postupným přidáváním LiOH byl zajištěn přechod do bazické oblasti pH. V průběhu obou titrací nebyla regulována iontová síla roztoků v kyvetách. Získaná spektra byla vyhodnocena v programu MestReNova a protonizační konstanty byly spočítány v programu P z balíčku programů OPIUM (<https://web.natur.cuni.cz/kyvala/opium.html>, verze z 30. 5. 2021).

3.9.2 Kinetická měření

Časové závislosti absorbancí systémů $\text{Ce}^{3+}-\text{L}^1$ a $\text{Ce}^{3+}-\text{L}^3$ na vlnové délce záření byly pořízeny spektrofotometrem Specord 50 Plus (Analytic Jena AG) v rozmezí vlnových délek 275–390 nm. Všechna měření byla prováděna při teplotě $25 \pm 0,1$ °C měřeného roztoku v křemenných kyvetách (1 cm) pomocí zařízení Peltier Block. Byly použity nekoordinující se pufry ($c = 0,2$ M): MCA/KOH (pH 3,04), HCOOH/KOH (pH 3,49 a 3,97) a DMP (pH 4,50 a 5,06). Konstantní iontová síla byla udržována pomocí vypočítaného množství KCl ($c = 0,5$ M).

Rychlostní konstanty komplexací byly spočítány proložením časových závislostí absorbancí při 345 nm (ligand L^3) a 360 nm (ligand L^1) teoretickou křivkou obecné exponenciální funkce 3.1,

$$A = A_f + (A_0 - A_f)e^{k_{\text{obs}}^f t} \quad (3.1)$$

kde A je rovno absorbanci, A_f odpovídá konečné absorbanci, A_0 značí počáteční absorbanci, t je čas a k_{obs}^f je experimentálně stanovená rychlostní konstanta reakce. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Micromath Scientist v2.0 [52] metodou nejmenších čtverců.

3.9.3 Potenciometrické titrace

Všechny titrace byly prováděny v aparatuře udržované na teplotě $25 \pm 0,1$ °C pomocí termostatu a při iontové síle $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (NMe_4Cl). Titrováno bylo rozmezí pH 1,7–11,9 pomocí pH-metru PHM 240, automatické pístové byrety ABU 900 (2 ml) a kombinované skleněné-argentchloridové elektrody GK 2401C (vše Radiometer). Titrace probíhaly v semii-nertním systému, který byl zajištěn konstantním prouděním N_2 nad titrovaným roztokem.

Elektrodotový systém byl kalibrován titracemi zásobního roztoku HCl (aq.) zásobním roztokem NMe_4OH (aq.), které byly prováděny před každou titrací ligandu nebo systému ligand-kov. Z kalibračních titrací byly podle rovnice 3.2 zjištěny kalibrační parametry: E_0 , standardní potenciál použité elektrody; S , „Nernstovská“ směrnice; j_1 a j_2 , koeficienty popisující kyselou a zásaditou chybu elektrody; K_w , iontový součin vody (13,81). Člen $K_w/[\text{H}^+]$ odpovídá koncentraci OH^- iontů v roztoku.

$$E = E_0 + S \log[\text{H}^+] + j_1[\text{H}^+] + \frac{j_2 K_w}{[\text{H}^+]} \quad (3.2)$$

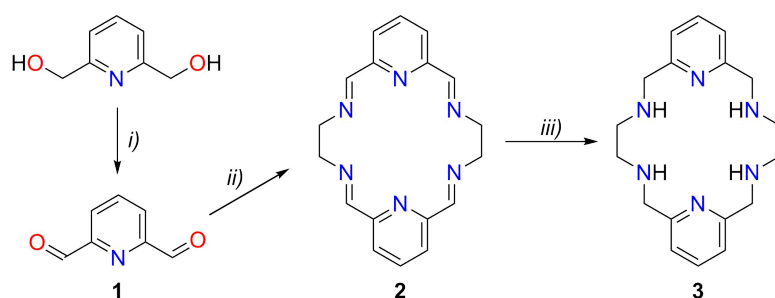
Stanovení disociačních konstant bylo prováděno podle stejného postupu, který je uveden v literatuře [53].

Kapitola 4

Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza ligandů

4.1.1 Příprava makrocyklu 3



Obrázek 4.1: Syntéza makrocyklu 3; i) $\text{MnO}_2/\text{CHCl}_3$, 75 °C, 6 h ii) metoda A: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2/\text{La}(\text{NO}_3)_3/\text{MeOH}$, 80 °C, 8 h metoda B: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2/\text{BaCl}_2/\text{MeOH}$, 80 °C, 4 h iii) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ (80 %, aq.), 0 °C, 4 h.

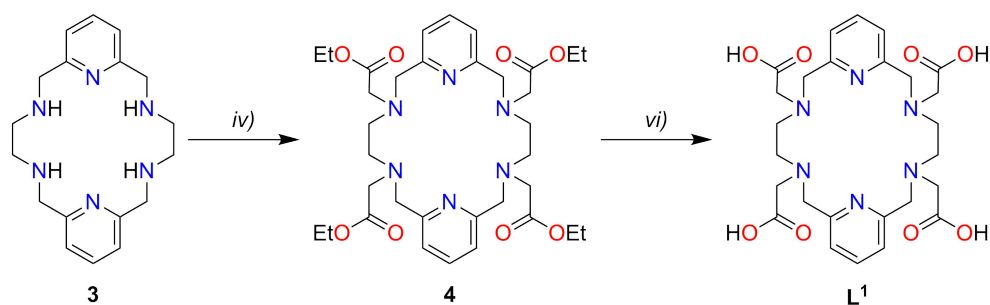
Příprava dialdehydu 1 byla provedena podle literatury [54]. K oxidaci alkoholových skupin byl využit výrobcem aktivovaný MnO_2 . Nízký výtěžek reakce je dán adsorbci produktu na práškovitý MnO_2 . Reakce probíhá kvantitativně s minoritním (< 2 % podle $^1\text{H-NMR}$) obsahem nedoreagovaného 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridinu již po 6 hodinách. Tento meziprodukt nijak nenarušuje následující templátovou syntézu makrocyklu 3. Je tedy možné tuto minoritní nečistotu zanedbat a látku 1 dále nečistit. Postupy založené na opětovném použití odfiltrovaného MnO_2 dosahovaly vždy nižšího výtěžku a čistoty.

Templátová syntéza makrocyklu 2 a jeho redukce na centrální prekurzor 3 byla nejprve provedena na Ba^{2+} (Metoda B) podle článku [55]. Jedná se o reakci, která využívá mechanismu reduktivní aminace. Tato syntéza však neposkytovala vysoké výtěžky a nevedla k dostatečné čistotě produktu. Stejný postup byl následně využit pro efektivnější přípravu makrocyklu 3 na

La^{3+} (Metoda A) podle článku [48]. Templátová syntéza pomocí La^{3+} probíhá podstatně rychleji (již po cca 15 minutách dochází ke srážení komplexu 2^{A}). Redukce připraveného komplexu 2^{A} probíhala kvantitativně až při použití téměř dvacetinásobku NaBH_4 . Tato skutečnost může být vysvětlena nežádoucím rozkladem NaBH_4 v 80% roztoku MeOH (aq.). Přítomnost dostatečného množství H_2O je však vynuceno rozpustností komplexu 2^{A} , která je za studena v čistém MeOH nízká.

Před odpařením byly nerozpuštěné borité soli odfiltrovány z reakční směsi. Odparek byl rozpuštěn v 5% roztoku NaOH (aq.), čímž bylo docíleno dekomplexace La^{3+} za vzniku $\text{La}(\text{OH})_3$. Vyloučený $\text{La}(\text{OH})_3$ byl odfiltrován. Koncentrace roztoku NaOH (aq.) by neměla být vyšší než 5 %. V bazičtějším prostředí dochází k vyšší sorpci makrocyklu **3** na povrch vysráženého $\text{La}(\text{OH})_3$. S ohledem na již uvedené probíhá syntéza makrocyklu **3** prostřednictvím metody A (průměrný výtěžek 86 %) lépe než metodou B (průměrný výtěžek 71 %) a s dostatečnou čistotou výsledného produktu. Elementární analýza ukázala, že touto metodou je připravený amin izolován jako trihydrát.

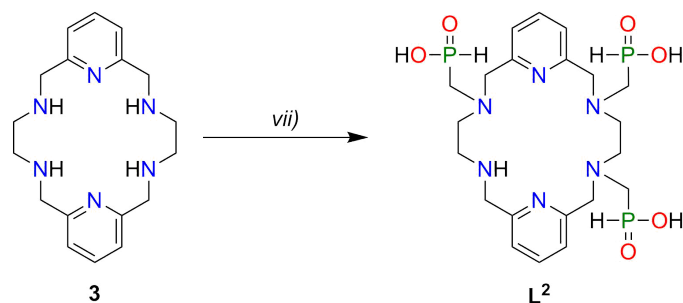
4.1.2 Přípravy ligandů L^1 , L^2 a L^3



Obrázek 4.2: Syntéza ligandu L^1 ; iv) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}/\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{ACN}$, 85°C , 6 h vi) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, 110°C , 6 h.

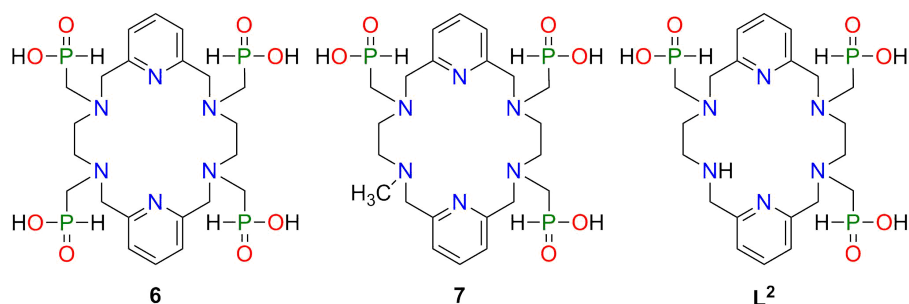
Syntéza ligandu L^1 byla provedena postupem uvedeným v článku [49], jenž byl doplněn o čištění makrocyklu **4** na silikagelové koloně a makrocyklu L^1 na chromatografické koloně s reverzní fází. Celkový výtěžek přípravy ligandu L^1 z makrocyklu **3** činí 57 %, což je o cca 10 % nižší výtěžek než v literatuře [49]. Postup v této práci využívá k odstranění NaCl , nezreagovaných výchozích látek a vedlejších produktů syntézy látky L^1 „flash“ chromatografii s gradientem mobilní fáze G1 uvedeným v Tab. 3.2. V literatuře [49] je zvoleno použití EtOH pro odstranění NaCl . Nicméně tato metoda má nedostatky v částečné rozpustnosti NaCl v EtOH , jejíž hodnota prudce narůstá již s malým podílem H_2O . „Flash“ chromatografie byla využita za účelem odstranění protogenních nečistot, které by mohly narušit potenciometrická měření ligandu L^1 . Při využití 0,1% vodného roztoku HCl jako mobilní fáze dochází k izolaci ligandu L^1 ve formě hydrátu hydrochloridu.

Uvedený sumární vzorec látky L^1 ($L^1 \cdot HBr \cdot 3 HCl \cdot 4 H_2O$) v experimentální sekci nejlépe odpovídá datům poskytnutým z elementární analýzy a potenciometrických titrací.



Obrázek 4.3: Syntézu ligandu L^2 ; vii) $H_3PO_2/CH_2O/EtOH$, 50 °C, 6 d.

Látka L^2 byla připravena za podmínek reakce Moedritzer–Iraniho reakce [56] v kyselém ethanolicím prostředí. Kyselé prostředí bylo zajištěno velkým nadbytkem 50% vodného roztoku H_3PO_2 . Reakce probíhá v uzavřeném systému, který brání depolymerizovanému paraformaldehydu vytékat ven z baňky. Ve srovnání s Kabachnik–Fieldsovou reakcí [57] probíranou dále v textu tato reakce zpravidla trvá déle. Pomocí $^{31}P\{^1H\}$ -NMR a ^{31}P -NMR bylo po uplynutí 6 dnů zjištěno, že reakční směs obsahuje převážně látku L^2 a požadovanou látku 6 (Obr. 4.4) pouze v malém množství.



Obrázek 4.4: Syntetizovaný ligand L^2 a vedlejší makrocyclické produkty 6 a 7.

V rámci pokusů o přípravu látky 6 byly vyzkoušeny 3 metody. První metoda spočívala v prodloužení reakční doby na 14 dnů. To však vedlo k degradaci ligandu L^2 nebo oxidování H_3PO_2 na H_3PO_3 . Druhá metoda spočívala ve vyčištění a izolování látky L^2 a jejím opětovném nasazením při stejných reakčních podmínkách. Ani tato metoda však nebyla úspěšná. Třetí metoda zahrnovala použití vyčištěné látky L^2 a jejím opětovném nasazení při podobných reakčních podmínkách. Místo EtOH byl však použit koncentrovaný roztok HCl (aq.). Tato metoda však skončila degradací látky L^2 po 3 dnech reakce. Rovněž bylo experimentálně ověřeno, že při zvýšení teploty reakční směsi dochází k rychlejší oxidaci H_3PO_2 na H_3PO_3 a také k rychlejší degradaci látky L^2 . Možným řešením problematického připojení čtvrtého

fosfinátového pendantního ramena by mohly být reakční podmínky založené na přítomnosti TFA. Jiným možným řešením by mohlo být využití alkylfosfinátových pendantních ramen.

Data poskytnutá analýzou makrocyclů **L**², **7** a **6** pomocí HPLC a MS jsou uvedena v tabulce (Obr. 4.4, Tab. 4.1). Jednotlivé analyty byly možné na analytickém HPLC dobře rozlišit, jelikož nedocházelo k přílišnému rozmývání elučních zón reakčních produktů. Pomocí analytického HPLC bylo zjištěno, že ligand **L**² byl ve směsi produktů přítomen z 80 %. Zbylých 20 % bylo představováno látkou **7** a požadovanou látkou **6**, jejíž příprava tímto způsobem neprobíhá kvantitativně. Bazicita posledního sekundárního aminu makrocyclu může být důvodem, proč reakce neprobíhá do čtvrtého stupně.

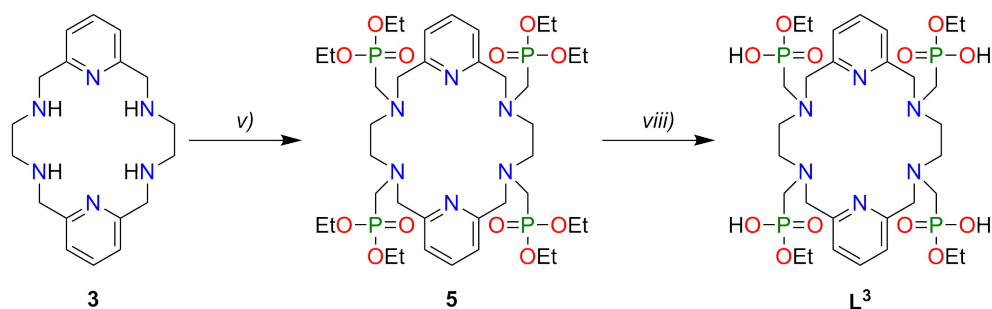
Tabulka 4.1: HPLC a MS analýza směsi reakčních produktů syntézy látky **L**².

Makrocyclus	$t_{R,i}/\text{min}$	MS		
L ²	0,88	561,18	(561,19)	$[\text{M} + \text{H}]^+$
7	0,67	575,20	(575,21)	$[\text{M} + \text{H}]^+$
		597,19	(597,19)	$[\text{M} + \text{Na}]^+$
6	0,50	639,23	(639,18)	$[\text{M} + \text{H}]^+$
		661,18	(661,16)	$[\text{M} + \text{Na}]^+$
		677,07	(677,13)	$[\text{M} + \text{K}]^+$

$t_{R,i}$ = retenční čas daného analytu na HPLC s gradientem H1 v Tab. 3.2.

Na rozdíl od ostatních syntetizovaných makrocyclických látek (zejména látek **L**¹ a **3**) nebylo možné jednoznačně přiřadit všechny signály ¹H-NMR a ¹³C{¹H}-NMR v důsledku jejich častému překryvu. Spektrum nebylo možné objasnit ani za použití HSQC a HMBC experimentů. Tato skutečnost je dána nesymetrií syntetizované molekuly **L**². V experimentální části jsou jako charakterizační spektra zvolena spektra ³¹P{¹H}-NMR a ³¹P-NMR měřena v silně bazickém pH (CsOH), kde dochází ke zúžení jednotlivých signálů oproti spektrům měřeným v kyselé oblasti pH. Takto pořízená spektra lze jednodušeji interpretovat.

Pro syntézu makrocyclu **5** byly využity reakční podmínky Kabachnik–Fieldsovi reakce [57]. Naše skupina nedávno navrhla nové podmínky této reakce (bezvodý pyridin, katalýza dvěma ekvivalenty silné kyseliny) [58]. Přítomnost H₂O vede k nežádoucí hydrolýze diethylfosfitu na nereaktivní monoethylfosfit. Přítomnost produktu této hydrolýzy snižuje výtěžek této reakce. Díky zvolené metodě izolace bylo v reaktantu **3** přítomno jisté množství H₂O (což potvrdila elementární analýza látky **3**). Tuto skutečnost potvrzuje i zvýšení výtěžku reakce po přidavku sušidla (bezvodého MgSO₄) do reakční směsi, které zabraňuje této hydrolýze. Trend efektivity reakce na množství přidaného sušidla při odpovídajících navážkách výchozích látek zachycuje Tab. 4.2. Reakce trvající déle než 3 dny neposkytovaly vyšší konverzi a docházelo pouze k další hydrolýze diethylfosfitu. Zvýšením teploty byla rovněž zvýšena rychlost hydrolýzy.



Obrázek 4.5: Syntéza ligandu L^3 ; v) $(CH_3CH_2O)_2P(O)H/CH_2O/py \cdot HBr/py$, 40 °C, 3 d viii) $Ba(OH)_2/MeOH$, 50 °C, 1 d.

Tabulka 4.2: Výtěžky reakcí při různých navážkách bezvodého $MgSO_4$.

m_{MgSO_4}/g	$y_1/\%$	$y_{hyd,1}/\%$	$y_3/\%$	$y_{hyd,3}/\%$
0	10	43	24	64
0,25	25	28	35	42
0,50	40	11	60	24

m_{MgSO_4} = navážka bezvodého $MgSO_4$, $y_{1/3}$ = konverze látky **3** na látku **5** po 1/3 dnech, $y_{hyd,1/3}$ = zastoupení hydrolyzovaného diethylfosfitu po 1/3 dnech.

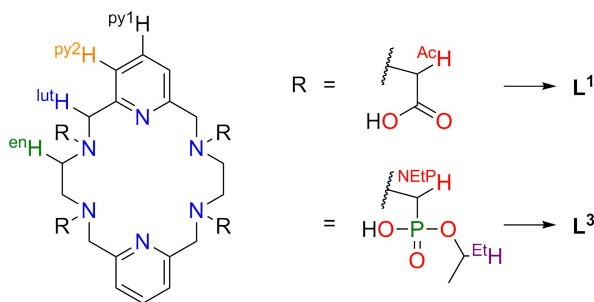
Promytím chloroformové fáze vodou byly odstraněny hydrofilní nečistoty v surovém produktu **5**. Hydrofobní nečistoty (zejména nezreagovaný diethylfosfit) bylo možné oddělit pomocí kationtového iontoměniče (Dowex 50 Wx4, 100 ml) promytím EtOH. K eluci makrocyclického meziproductu **5** byly vždy zapotřebí velké objemy elučního činidla (alespoň 500 ml). Eluce byla nejprve uskutečněna pomocí 10%, následně 25%, vodného roztoku pyridinu. Nicméně i při použití 50% pyridinu (aq.) docházelo k podstatnému rozmývání a silné retenci látky **5** k chromatografické stacionární fázi. Nejlepšího dělení bylo dosaženo při eluci makrocyccku **5** směsí *i*PrOH:NH₃ 4:1. Vysoký výtěžek ve srovnání s konverzí podle ³¹P-NMR je dán přítomností zbytkových rozpouštědel (zejména H₂O) v hnědočerveném oleji makrocyccku **5**.

Selektivní hydrolyza na monoestery byla provedena v nasyceném roztoku $Ba(OH)_2$ (aq.). Před odpařením byla směs zbavena heterogenních nečistot filtrací na fritě o zrnitosti S4. Tyto nečistoty byly především představovány jistým množstvím nerozpuštěného $BaCO_3$. Filtrát nebyl odpařen do sucha, aby nedošlo k přílišnému zakoncentrování $Ba(OH)_2$ ve směsi. Pro oddělení produktu reakce od $Ba(OH)_2$ byla zvolena metoda ionexové chromatografie. V důsledku zvýšení polarity makrocyccku L^3 bylo možné produkt eluovat z kationtového iontoměniče za použití 50% roztoku pyridinu (aq.). Po lyofilizaci byl makrocycckus L^3 izolován ve formě hydrátu hydrochloridu, jelikož při čištění pomocí „flash“ chromatografie byla použita mobilní fáze 0,1% roztok HCl (aq.). Izolaci produktu ve formě krystalů nebo sraženiny se nepodařilo úspěšně

realizovat. Připravená lyofilizovaná látka L^3 byla hygroskopická a v důsledku skladování díky přítomnosti fosfonátových monoesterů a molekul HCl v izolované látce docházelo k její postupné další deesterifikaci na volné fosfonátové skupiny. Izolování této látky jako zwitter-ion by mohlo tento problém vyřešit.

4.2 Stanovení protonizačních konstant ligandů

NMR spektra byla sfázována a referencována signálem vnějšího standardu $t\text{BuOH}$ ($\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm). Pomocí programu OPIUM byly z jednoznačného průběhu signálů skupin v závislosti na pH vypočítány hodnoty $\log K_{\text{A}}$. Na obrázcích (Obr. 4.8 a 4.9) je zachycen přehled chemických posunů vodíkových signálů ligandů L^1 a L^3 a jejich distribuční diagramy, které byly vypočítány z potenciometrických dat. Série chemických posunů vodíkových signálů byly proloženy teoretickými křivkami. Chemické posuny signálu vodíku $^{\text{lut}}\text{H}$ (Obr. 4.6) byly odečítány až od $\text{pH} < 4$ pro jejich zákryt se signály H_2O v kyselé oblasti titračního experimentu.



Obrázek 4.6: Označení vodíkových signálů ^1H -NMR titrací látek L^1 a L^3 .

Hodnoty konstant $\log K_{\text{A}}$ získané z NMR titračních experimentů a potenciometrických stanovení jsou pro porovnání uvedeny v tabulkách (Tab. 4.3 a 4.5).

Hodnoty $\log K_{\text{A}}$ látky L^1 se až na nejnižší hodnotu (konstanta pendantního karboxylátu) dobře shodují. Nejvyšší stanovená konstanta $\log K_{\text{A}}$ pomocí LiOH jako titračního činidla je snížena. Záměnou titračního činidla za CsOH byla stanovena hodnota $\log K_{\text{A}}$ porovnatelná se získanou hodnotou z potenciometrických měření. Vyhodnocením NMR titrace ligandu L^1 s titračním činidlem CsOH nebylo možné stanovit druhou hodnotu $\log K_{\text{A}}$ diaminové části makrocyclu s dostatečnou přesností.

Průběh protonizace ligandu L^1 při přechodu pH ze silně bazické oblasti do kyselé nebylo možné jednoznačně definovat. Jak ukazují titrační křivky (Obr. 4.8), plně deprotonovaný ligand je při pH cca 9 postupně protonizován v obou oblastech ethyldiaminových úseků makrocyclu. Po dosažení pH cca 6 dochází pravděpodobně k protonizaci pyridinových atomů dusíku. Je-li pH dále snižováno, dochází k nejednoznačně interpretovatelné protonové redistribuci, která je spojena s protonizací karboxylátových pendantních ramen.

Stanovené hodnoty konstant $\log K_A$ látky L^1 se příliš neliší od konstant stanovených v literatuře [51] (Tab. 4.4). Mimoto byly určeny hodnoty protonizačních konstant týkající se pendantních karboxylátových ramen. Ve srovnání s ligandem H_4dota [43] nejsou aminové atomy dusíku tolik bazické (Tab. 4.4).

Tabulka 4.3: Porovnání hodnot protonizačních konstant ($\log K_A$) ligandu L^1 stanovených potenciometricky a NMR titrací.

Potenciometrie L^1	NMR titrace L^1		
$\log K_A^1$	$\log K_A(Li^+)$	$\log K_A(Cs^+)$	Protonizovaná oblast
9,35(1)	8,9(1)	9,2(1)	makrocyklus (diamin)
8,72(1)	8,4(1)	–	makrocyklus (diamin)
5,70(1)	5,6(1)	5,9(1)	makrocyklus (pyridin)
4,62(1)	4,6(1)	4,5(1)	makrocyklus (pyridin)
2,76(1)	2,7(1)	2,7(1)	pendantní karboxylát
1,84(1)	1,2(2)	1,3(2)	pendantní karboxylát

¹ 0,10 M NMe_4Cl , 25 °C.

Tabulka 4.4: Porovnání potenciometricky stanovených protonizačních konstant ($\log K_A$) ligandu L^1 s literaturou ($H_4py_2N_4Ac_4$) a s makrocyclickými ligandy H_4dota a H_4teta .

h	H_4L^1	$H_4py_2N_4Ac_4$ [51]	H_4dota [43]	H_4teta [43]
1	9,35(1)	9,37	12,09	10,68
2	8,72(1)	8,81	9,68	10,14
3	5,70(1)	5,80	4,55	4,09
4	4,62(1)	4,71	4,13	3,35
5	2,76(1)	–	–	–
6	1,84(1)	–	–	–

h = stupeň protonizace.

Hodnoty $\log K_A$ látky L^3 se až na nejvyšší hodnotu (protonizace příslušející ethylendiaminu) dobře shodují. Nejvyšší stanovená konstanta $\log K_A$ pomocí $LiOH$ jako titračního činidla je snížena o jeden řád. Analogickou záměnou titračního činidla za $CsOH$ jako v případě látky L^1 by pravděpodobně mohla být stanovená hodnota $\log K_A$ blíží se více hodnotě z potenciometrických měření.

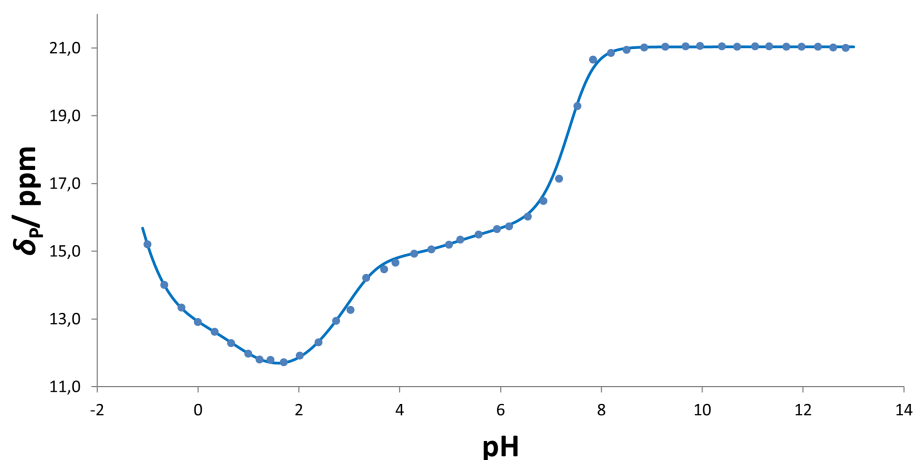
Ve srovnání s látkou L^1 dosahuje látka L^3 nižších hodnot protonizačních konstant. Průběh protonizace ligandu L^3 stejně jako ligandu L^1 nebylo možné jednoznačně definovat. Ethylesterfosfonátová pendantní ramena jsou protonizována až při dosažení $pH < 1$. Tato skutečnost je

kvalitativně doložena křivkou průběhu závislosti chemického posunu signálů ^{31}P -NMR látky L^3 na pH při použití LiOH jako titračního činidla (Obr. 4.7). Změnou pH do záporných hodnot dochází ke zvýšení hodnot chemického posunu signálů ^{31}P -NMR látky L^3 , což koreluje s protonizací těchto skupin. Body titrací látky L^3 (Obr. 4.7 a 4.9) při $\text{pH} < 1$ byly získány měřením roztoků látky L^3 , jejichž pH bylo zajištěno výpočtem.

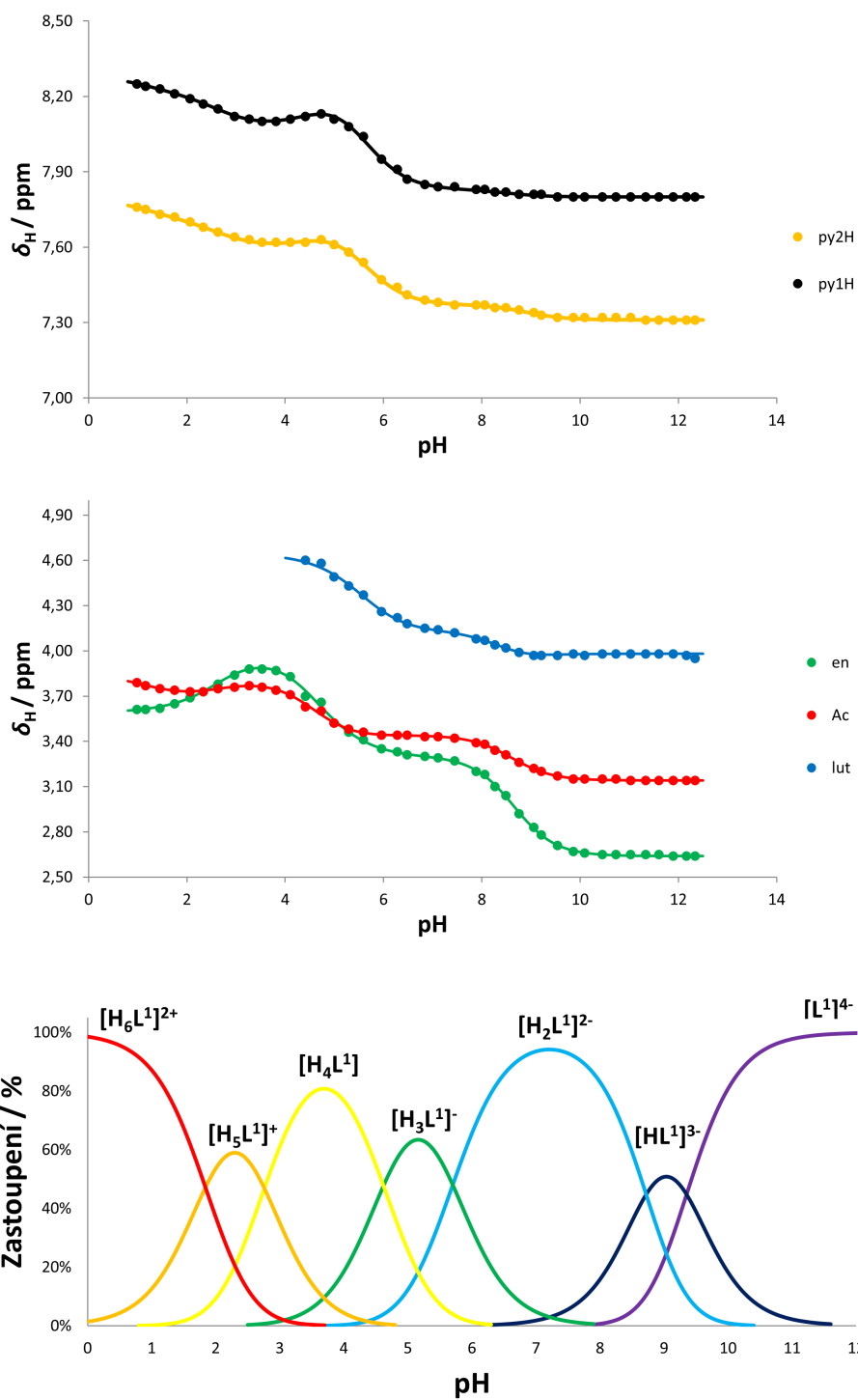
Tabulka 4.5: Porovnání hodnot protonizačních konstant ($\log K_A$) ligandu L^3 stanovených potenciometricky a NMR titrací.

Potenciometrie $\log K_A^1$	NMR titrace L^3	
	$\log K_A(\text{Li}^+)$	Protonizovaná oblast
8,66(2)	7,5(1)	makrocyklus (diamin)
7,24(3)	7,3(1)	makrocyklus (diamin)
5,01(3)	5,5(1)	makrocyklus (pyridin)
3,01(4)	3,0(1)	makrocyklus (pyridin)
–	-0,5(1)	pendantní fosfonát

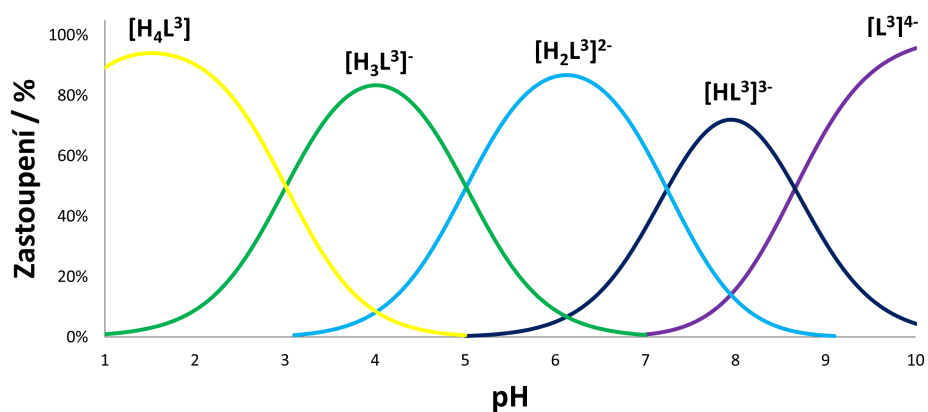
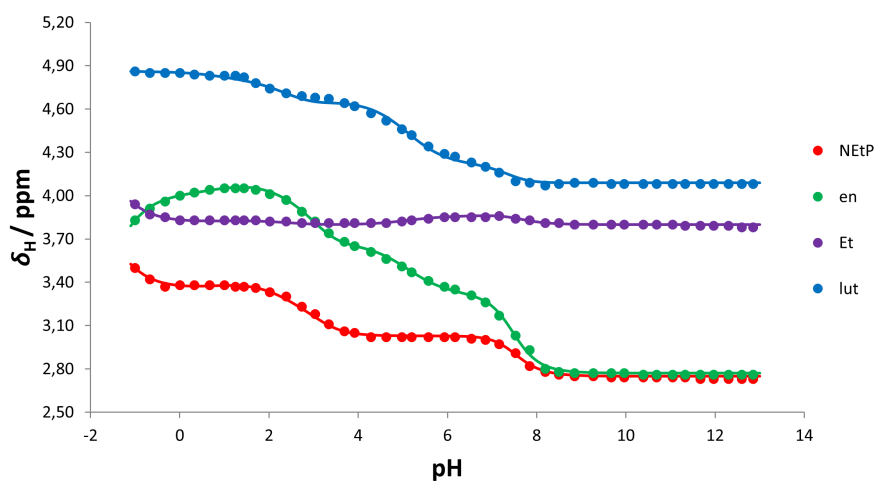
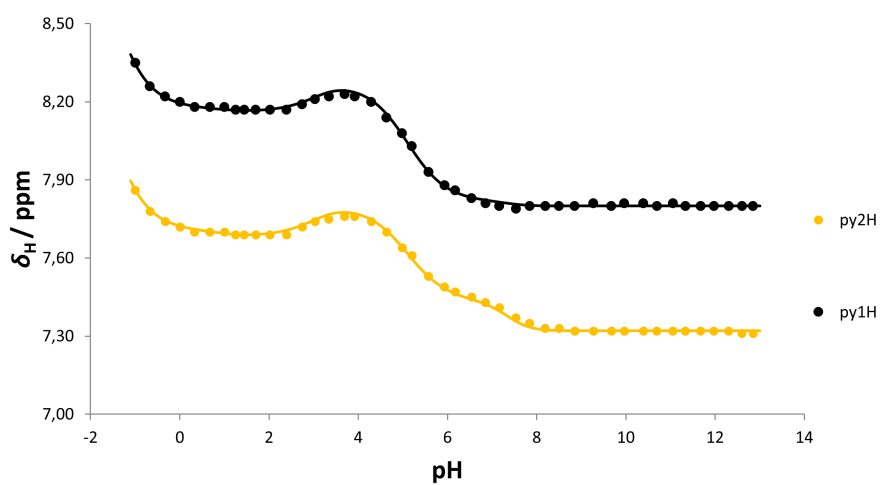
¹ 0,10 M NMe_4Cl , 25 °C.



Obrázek 4.7: Průběh závislosti chemického posunu signálů ^{31}P -NMR látky L^3 na pH v přítomnosti iontu Li^+ .



Obrázek 4.8: Distribuční diagram a průběh závislosti chemického posunu signálů 1H -NMR látky L^1 na pH v přítomnosti iontu Li^+ .



Obrázek 4.9: Distribuční diagram a průběh závislosti chemického posunu signálů ^1H -NMR látky L^3 na pH v přítomnosti iontu Li^+ .

4.3 Stanovení konstant stability komplexů ligandu L^1 s Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+}

Výsledky z potenciometrických titrací komplexů ligandu L^1 s ionty Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} jsou shrnuty v tabulce (Tab. 4.6). Ve srovnání s hodnotami uvedenými v literatuře [51] byl v této práci pozorován malý pokles hodnot konstant stability. Porovnání konstant stability s různými ligandy je uvedeno v tabulce (Tab. 4.7). Podle všech uvedených konstant stability platí, že ligand H_4dota vytváří s ionty Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} nejstabilnější komplexy. Ligand H_4L^1 vytváří stabilnější komplexy s ionty Ca^{2+} a Sr^{2+} než ligand $H_2macropa$. Nicméně ve srovnání s ligandem $H_2macropa$ vykazuje ligand H_4L^1 nižší selektivitu pro velké dvojmocné ionty kovů.

Distribuční diagramy komplexů ligandu L^1 s Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} jsou uvedeny níže (Obr. 4.10). Ve všech případech je komplex s ligandem H_4L^1 dostatečně stálý a v systému není přítomen žádný volný iont daného kovu. Hydroxokomplexy daného kovu nemají žádné zastoupení.

Tabulka 4.6: Konstanty stability ($\log K_{ML}$) komplexů ligandu L^1 s Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} a jejich porovnání s literaturou.

Ligand	Systém	<i>hlm</i>	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
H_4L^{11}	$[M(L)]$	011	12,81(1)	12,56(1)	10,61(1)
	$[M(HL)]$	111	5,31(1)	5,14(1)	5,73(1)
$H_4py_2N_4Ac_4$ [51] ²	$[ML]$	011	13,6	12,7	11,0
	$[M(HL)]$	111	5,1	–	–

¹ 0,10 M NMe_4Cl , 25 °C.

² 0,10 M KCl , 25 °C.

Tabulka 4.7: Porovnání konstant stability ($\log K_{ML}$) komplexů ligandů L^1 , H_4dota , H_4teta a $H_2macropa$.

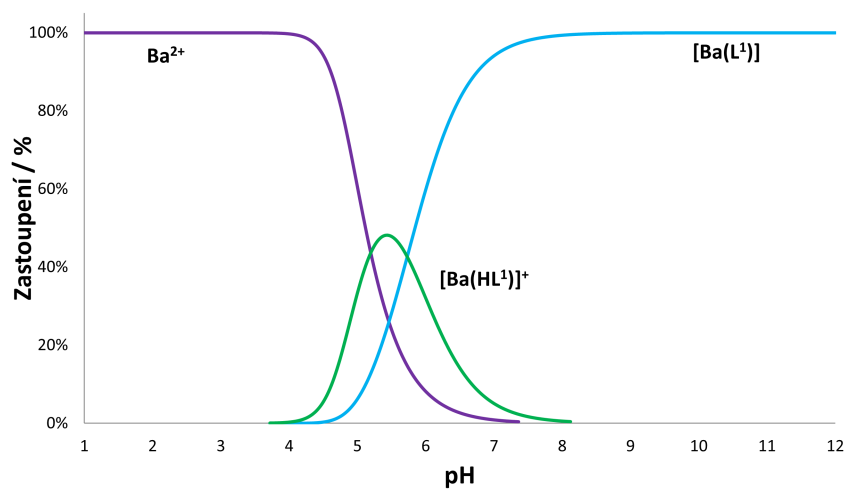
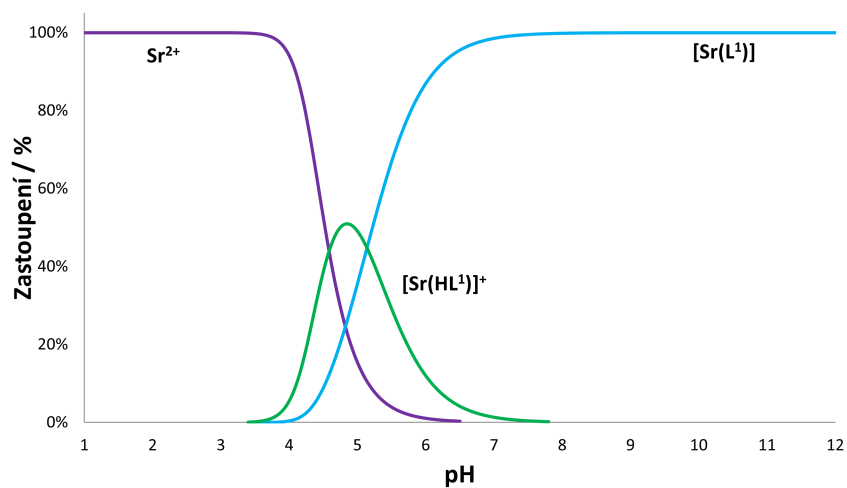
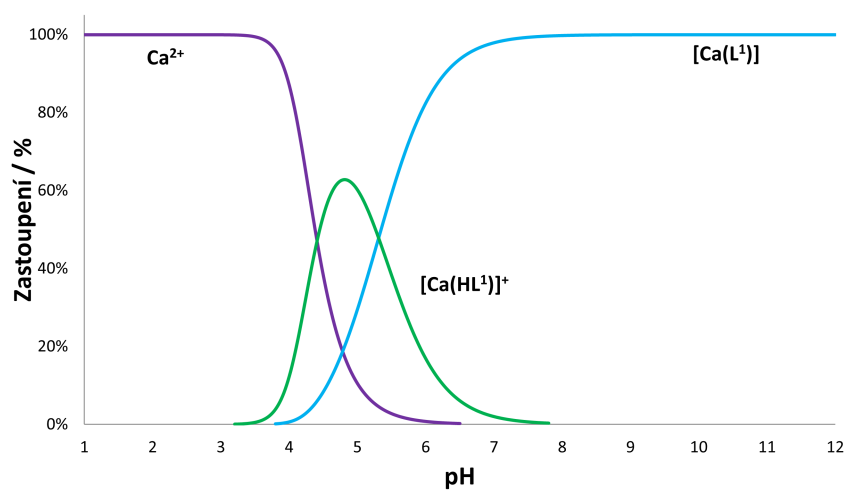
Ion	H_4dota [43] ¹	H_4teta [43] ²	$H_2macropa$ [42] ³	H_4L^{14}
Ca^{2+}	17,23	8,32	5,79	12,81
Sr^{2+}	15,22	5,73	9,44	12,56
Ba^{2+}	12,87	3,85	11,11	10,61

¹ 0,10 M NMe_4NO_3 , 25 °C.

² 0,10 M KNO_3 , 25 °C.

³ 0,10 M KCl , 25 °C.

⁴ 0,10 M NMe_4Cl , 25 °C.



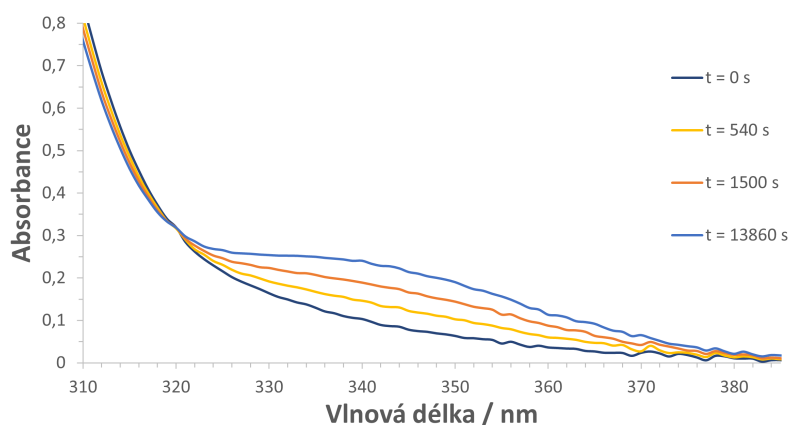
Obrázek 4.10: Distribuční diagramy komplexů ligandu L^1 s Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} . Koncentrace ligandu a příslušných kationtů byla vždy $4 \times 10^{-3} \text{ M}$.

4.4 Kinetika komplexace Ce^{3+} s ligandy L^1 a L^3

Jelikož doposud neexistují žádná publikovaná data týkající se komplexačních nebo dekomplexačních kinetik komplexů ligandů L^1 a L^3 , byly provedeny základní experimenty, které umožní navrhnout způsob provádění těchto experimentů při dalším studiu těchto systémů v budoucnosti.

První sada experimentů byla provedena pro ligandy L^1 a L^3 při pH 3,04 v poměru 1:1 s ionty Ce^{3+} ($c_{\text{Ce}} = c_{\text{L}} = 1 \text{ mM}$) (Obr. 4.11 a 4.13). Na základě pořízených spekter bylo zjištěno, že *out-of-cage* komplex ligandu L^1 s ionty Ce^{3+} vzniká při daném pH ihned. Během několika minut dochází ke vzniku prvního *in-cage* komplexu s absorpčním maximem při vlnové délce cca 345 nm (Obr. 4.13). Tento komplex pravděpodobně podléhá reorganizaci koordinovaných pendantních ramen. Během hodin dochází ke vzniku druhého *in-cage* komplexu s absorpčním maximem při vlnové délce cca 360 nm. Tento proces probíhá už ve chvíli, kdy ještě není *out-of-cage* komplex úplně přeměněný na první *in-cage* komplex. Tato skutečnost může být vysvětlena tak, že první *in-cage* komplex má všechna pendantní ramena koordinována na centrální ion z jedné strany roviny makrocyclického kruhu. Následně dojde k reorganizaci pendantů na druhý *in-cage* komplex, kde jsou pendantní ramena již koordinována z obou stran roviny makrocyclického kruhu. Toto vysvětlení se rovněž opírá o struktury komplexů ligandu L^1 s ionty Ln^{3+} v pevné fázi [27, 49].

V případě experimentů s komplexy ligandu L^3 nebyla pozorována dvě různá absorpční maxima odpovídající dvěma různým formám *in-cage* komplexů. *Out-of-cage* komplex ligandu L^3 s Ce^{3+} vzniká ihned a během několika minut dochází k přeměně tohoto komplexu na formu *in-cage* s absorpčním maximem při vlnové délce cca 345 nm. Narozdíl od komplexu ligandu L^1 nedochází k rychlé reorganizaci ethylesterfosfonátových pendantních ramen za vzniku komplexu s absorpčním maximem při vlnové délce cca 360 nm (Obr. 4.11) [27, 49].

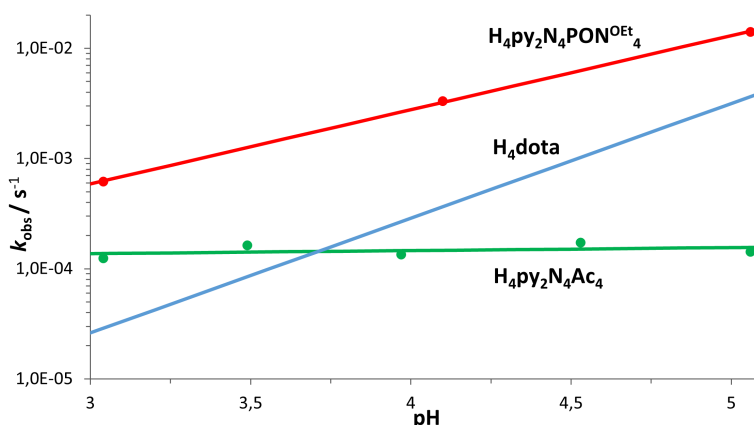


Obrázek 4.11: UV-vis spektrum ligandu L^3 s Ce^{3+} při pH 3,04 v poměru 1:1 ($c_{\text{Ce}} = c_{\text{L}} = 1 \text{ mM}$) v závislosti na čase. Graf ukazuje přeměnu *out-of-cage* komplexu na *in-cage* komplex s absorpčním maximem při vlnové délce cca 345 nm.

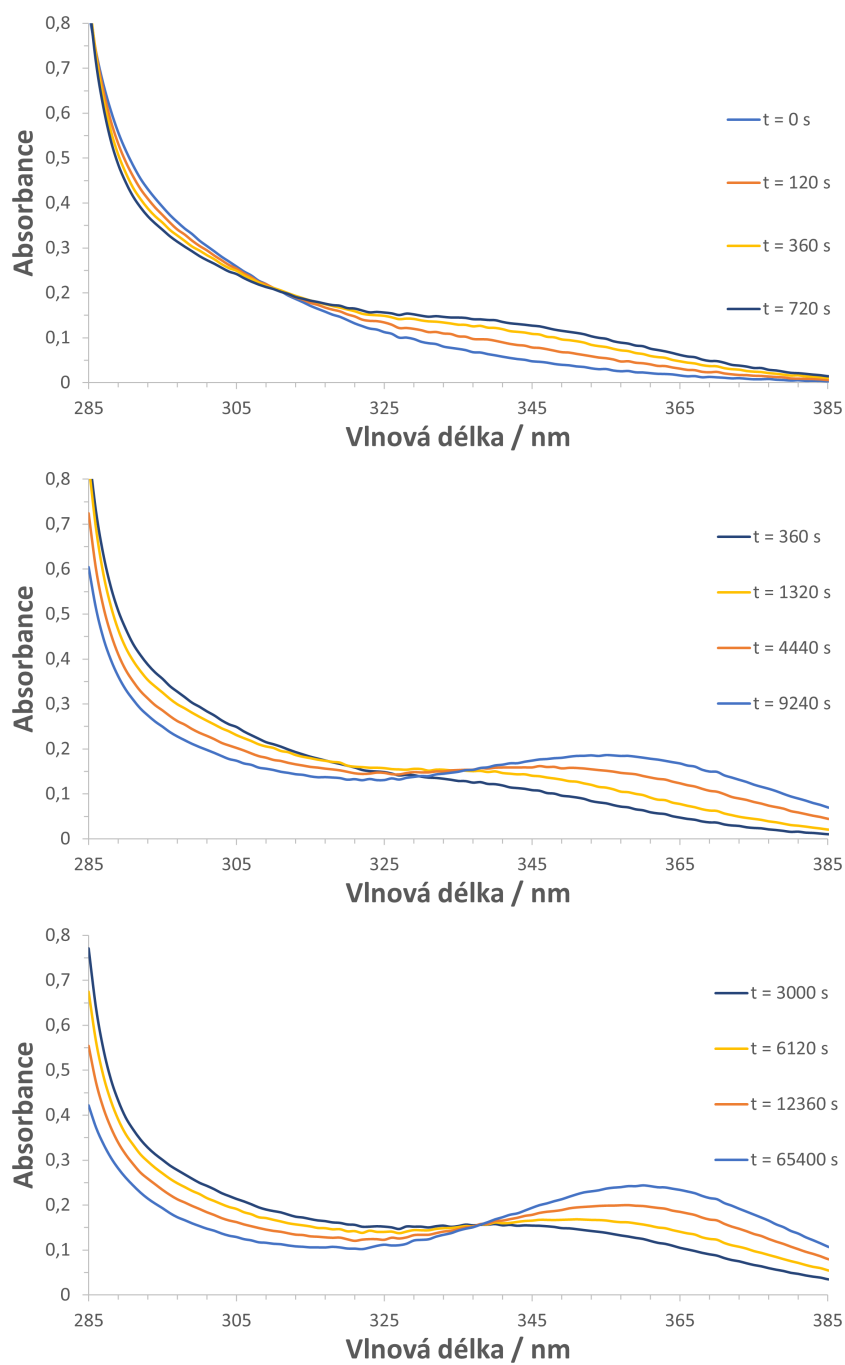
Ke stanovení rychlostních konstant vzniku komplexů ligandů L^1 a L^3 s ionty Ce^{3+} byly použity podmínky „pseudo-first order“ (velký přebytek iontů Ce^{3+}). Proložení časové závislosti absorbance při 345 nm (ligand L^3) a 360 nm (ligand L^1) teoretickou křivkou exponenciální funkce 3.1 byly stanoveny rychlostní konstanty komplexace iontů Ce^{3+} ligandem L^1 a ligandem L^3 v závislosti na pH. Uvedené vlnové délky byly vybrány na základě největší relativní změny absorbance v čase. Při všech měřeních byla koncentrace limitující složky (ligandu) 1×10^{-3} M. Koncentrace iontů Ce^{3+} byla vždy $50\times$ vyšší.

Kinetika komplexace iontů Ce^{3+} ligandem L^1 není ovlivněna změnou pH v rozmezí pH 3 až 5. Oproti tomu jsou rychlostní konstanty komplexace iontu Ce^{3+} ligandem L^3 na pH závislé. Ve srovnání s ligandem H_4dota ligand L^3 komplexuje ionty Ce^{3+} za stejných experimentálních podmínek rychleji (Obr. 4.12) [59]. Na rozdíl od komplexací v poměru 1:1 byly pro komplexy ligandu L^1 pozorovány pouze první formy *in-cage* komplexu s absorpčním maximem při cca 345 nm [27].

Pro kompletní pochopení kinetiky vzniku komplexů s připravenými ligandy a ionty Ce^{3+} je nutné proměřit pH závislost vzniku komplexů při různých přebytcích ligandu a iontů kovu. Pro potenciální klinické použití těchto komplexů je důležitá jejich kinetická inertnost. Experimenty popisující dekomplexační kinetiku budou provedeny do termínu obhajoby této bakalářské práce.



Obrázek 4.12: Porovnání stanovených rychlostních konstant komplexací iontu Ce^{3+} ligandem $H_4py_2N_4Ac_4$ (L^1) nebo ligandem $H_4py_2N_4PON^{OEt}_4$ (L^3). V obou případech byla koncentrace ligandu 1×10^{-3} M, koncentrace iontů Ce^{3+} byla $50\times$ vyšší. Data pro ligand H_4dota při stejných experimentálních podmínkách byla převzata z literatury [59].



Obrázek 4.13: UV-vis spektra ligandu L^1 s Ce^{3+} při pH 3,04 v poměru 1:1 ($c_{Ce} = c_L = 1 \text{ mM}$) v závislosti na čase. První graf ukazuje přeměnu *out-of-cage* komplexu na první *in-cage* komplex s absorpčním maximem při vlnové délce cca 345 nm. Třetí graf ukazuje přeměnu prvního *in-cage* komplexu na druhou formu *in-cage* komplexu s absorpčním maximem při vlnové délce cca 360 nm. Druhý graf ilustruje současný průběh těchto dějů.

Kapitola 5

Závěr

V rámci této bakalářské práce byly syntetizovány ligandy L^1 a L^3 v dostatečném množství a čistotě pro jejich charakterizaci. Ligand L^2 se nepodařilo syntetizovat. Pokusy o jeho syntézu vždy skončily na makrocyclu se třemi (nikoli čtyřmi) fosfinátovými pendantními rameny.

Připravené ligandy L^1 a L^3 byly charakterizovány NMR titracemi a potenciometrickou analýzou. Jednotlivé sady hodnot $\log K_A$ získané oběmi metodami jsou v dobré shodě.

Potenciometrickou titrací byly stanoveny konstanty stability ligandu L^1 s ionty Ca^{2+} , Sr^{2+} a Ba^{2+} . Ligand L^1 vytváří stabilnější komplexy s ionty Ca^{2+} a Sr^{2+} než ligand $H_2macropa$. Ve srovnání s ligandem $H_2macropa$ nedosahuje takové selektivity pro velké dvojmocné ionty kovů. Selektivita pro velké trojmocné ionty kovů bude námětem studií v navazující diplomové práci. Podobné studie budou provedeny i pro ligand L^3 .

Rychlostní konstanty komplexace iontů Ce^{3+} ligandy L^1 a L^3 byly stanoveny spektrofotometricky v závislosti na pH. Pro všechna měření byl zajištěn padesátinásobný nadbytek Ce^{3+} . Za daných podmínek (výrazný přebytek iontů Ce^{3+} , podmínky „pseudo-first-order“) ligand L^3 komplexuje ion Ce^{3+} rychleji než H_4dota . Komplexace ligandu L^1 probíhá složitým mechanismem, který z časových důvodů nebyl v rámci této bakalářské práce studován. Kompletní sestavení kinetických parametrů komplexací iontů Ce^{3+} ligandy L^1 a L^3 (tedy proměření závislosti různých koncentračních poměrů kov:ligand) bude předmětem studií navazující diplomové práce. Stejně tak i podrobnější prostudování komplexačního mechanismu ligandu L^1 .

Kinetika dekomplexačních reakcí nebyla z časových důvodů studována. Dekomplexace komplexů s ligandy L^1 a L^3 budou zkoumány v navazující diplomové práci.

Studie makrocyclických ligandů L^1 a L^3 poukázaly na jejich dobrý potenciál pro možnou komplexaci iontů Ac^{3+} , a to zejména z hlediska jejich termodynamické stability s velkými dvojmocnými ionty a rychlosti komplexace iontu Ce^{3+} . Budou-li i další studie na „modelových“ iontech kovů vykazovat dostatečnou termodynamickou stabilitu a kinetickou inertnost, bude možno provést přímé studie na iontech Ac^{3+} ve spolupráci se zahraničními pracovišti, které mohou pracovat s tímto prvkem.

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli Petrovi Hermannovi za jeho inspirativní elán a nasazení. Rád bych mu poděkoval za spoustu rad, nápadů a nespočetné množství konzultací, na které byl ochoten si obratem udělat čas. Dále bych rád poděkoval Vojtovi Kubíčkovi za jeho pomoc při vyhodnocování dat z kinetických měření, NMR titrací a potenciometrie. Můj velký dík patří i rodině Malého labu, která mě do sebe ochotně přijala a která mi velmi pomohla při psaní této práce. Jmenovitě zejména Petrovi Urbanovskému, na kterého jsem se mohl kdykoliv s čímkoliv obrátit a který mi byl oporou při práci v laboratoři.

Dále bych chtěl poděkovat všem svým blízkým kamarádům a rodině, kteří mě nikdy nepřestali podporovat v mém snažení (ať už chemickém nebo ne). V rámci této práce zejména své trpělivé sestřičce Kateřině Faltejskové, která mi dokázala vždy poradit s problémy v Latexovém prostředí. Mnohokrát děkuji.

Seznam použité literatury

1. GUDKOV, S. V.; SHILYAGINA, N. Y.; VODENEEV, V. A.; ZVYAGIN, A. V. Targeted radio-nuclide therapy of human tumors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **17**(1), 1–19. ISSN 14220067. Dostupné z DOI: 10.3390/ijms17010033.
2. CARROLL, V.; DEMOIN, D. W.; HOFFMAN, T. J.; JURISSON, S. S. Inorganic chemistry in nuclear imaging and radiotherapy: Current and future directions. *Radiochimica Acta*. 2012, **100**(8-9), 653–667. ISSN 00338230. Dostupné z DOI: 10.1524/ract.2012.1964.
3. OLMO-GARCÍA, M. I. del; MUROS, M. A.; TORRE, M. López-de-la; AGUDELO, M.; BELLO, P.; SORIANO, J. M.; MERINO-TORRES, J.-F. Prevention and management of hormonal crisis during theragnosis with LU-DOTA-TATE in neuroendocrine tumors. A systematic review and approach proposal. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, **9**(7), 2203. ISSN 2077-0383. Dostupné z DOI: 10.3390/jcm9072203.
4. SANGRO, B.; CARPANESE, L.; CIANNI, R.; GOLFIERI, R.; GASPARINI, D.; EZZIDDIN, S.; PAPROTTKA, P. M.; FIORE, F.; VAN BUSKIRK, M.; IGNACIO BILBAO, J.; MARIA ETTORRE, G.; SALVATORI, R.; GIAMPALMA, E.; GEATTI, O.; WILHELM, K.; THORSTEN HOFFMANN, R.; IZZO, F.; IÑARRAIRAEGUI, M.; LUDOVICO MAINI, C.; URIGO, C.; CAPPELLI, A.; VIT, A.; AHMADZADEHFAR, H.; FRANZ JAKOBS, T.; LASTORIA, S. Survival after yttrium-90 resin microsphere radioembolization of hepatocellular carcinoma across Barcelona clinic liver cancer stages: A European evaluation. *Hepatology*. 2011, **54**(3), 868–878. ISSN 02709139. Dostupné z DOI: 10.1002/hep.24451.
5. BOS, S. D. An overview of current clinical experience with strontium-89 (Metastron®). *The Prostate*. 1994, **25**(5), 23–26. ISSN 0270-4137. Dostupné z DOI: 10.1002/pros.2990250708.
6. SARTOR, O.; REID, R. H.; HOSKIN, P. J.; QUICK, D. P.; ELL, P. J.; COLEMAN, R. E.; KOTLER, J. A.; FREEMAN, L. M.; OLIVIER, P. Samarium-153-lexidronam complex for treatment of painful bone metastases in hormone-refractory prostate cancer. *Urology*. 2004, **63**(5), 940–945. ISSN 00904295. Dostupné z DOI: 10.1016/j.urology.2004.01.034.
7. POUGET, J. P.; NAVARRO-TEULON, I.; BARDIÈS, M.; CHOUIN, N.; CARTRON, G.; PÈLEGRIN, A.; AZRIA, D. Clinical radioimmunotherapy-the role of radiobiology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011, **8**(12), 720–734. ISSN 17594774. Dostupné z DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.160.

8. KRUIJFF, R. M. de; WOLTERBEEK, H. T.; DENKOVA, A. G. A critical review of alpha radionuclide therapy-how to deal with recoiling daughters? *Pharmaceuticals*. 2015, **8**(2), 321–336. ISSN 14248247. Dostupné z DOI: 10.3390/ph8020321.
9. FANO, U. Penetration of protons, alpha particles, and mesons. *Annual Review of Nuclear Science*. 1963, **13**(1), 1–66. ISSN 0066-4243. Dostupné z DOI: 10.1146/annurev.ns.13.120163.000245.
10. MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C.; KRATOCHWIL, C.; SATHEKGE, M.; KROLICKI, L.; BRUCHERTSEIFER, F. An overview of targeted alpha therapy with ²²⁵actinium and ²¹³bismuth. *Current Radiopharmaceuticals*. 2018, **11**(3), 200–208. ISSN 18744710. Dostupné z DOI: 10.2174/1874471011666180502104524.
11. SGOUROS, G.; ROESKE, J. C.; MCDEVITT, M. R.; PALM, S.; ALLEN, B. J.; FISHER, D. R.; BRILL, A. B.; SONG, H.; HOWELL, R. W.; AKABANI, G.; BOLCH, W. E.; MEREDITH, R. F.; WESSELS, B. W.; ZANZONICO, P. B. MIRD pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and dosimetry of α -particle emitters for targeted radionuclide therapy. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010, **51**(2), 311–328. ISSN 01615505. Dostupné z DOI: 10.2967/jnumed.108.058651.
12. DESHAYES, E.; ROUMIGUIE, M.; THIBAUT, C.; BEUZEBOC, P.; CACHIN, F.; HENNEQUIN, C.; HUGLO, D.; ROZET, F.; KASSAB-CHAHMI, D.; REBILLARD, X.; HOUÉDÉ, N. Radium 223 dichloride for prostate cancer treatment. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017, **11**, 2643–2651. ISSN 11778881. Dostupné z DOI: 10.2147/DDDT.S122417.
13. WADAS, T. J.; PANDYA, D. N.; SAI, K. K. S.; MINTZ, A. Molecular targeted α -particle therapy for oncologic applications. *American Journal of Roentgenology*. 2014, **203**(2), 253–260. ISSN 15463141. Dostupné z DOI: 10.2214/AJR.14.12554.
14. BRULAND, Ø. S.; NILSSON, S.; FISHER, D. R.; LARSEN, R. H.; VESSELLA; WEILBAECHER; BOYCE; GUISE; BERENSON; POWLES. High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the α -emitter ²²³Ra: Adjuvant or alternative to conventional modalities? *Clinical Cancer Research*. 2006, **12**(20 PART 2), 6250–6258. ISSN 10780432. Dostupné z DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0841.
15. ALLEN, B. J.; RAJA, C.; RIZVI, S.; LI, Y.; TSUI, W.; GRAHAM, P.; THOMPSON, J. F.; REISFELD, R. A.; KEARSLEY, J.; MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C. Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biology and Therapy*. 2005, **4**(12), 1318–1324. ISSN 15558576. Dostupné z DOI: 10.4161/cbt.4.12.2251.
16. ZALUTSKY, M. R.; REARDON, D. A.; AKABANI, G.; COLEMAN, R. E.; FRIEDMAN, A. H.; FRIEDMAN, H. S.; MCLENDON, R. E.; WONG, T. Z.; BIGNER, D. D. Clinical experience with α -particle-emitting ²¹¹At: Treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008, **49**(1), 30–38. ISSN 01615505. Dostupné z DOI: 10.2967/jnumed.107.046938.

17. KRATOCHWIL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; GIESEL, F. L.; WEIS, M.; VERBURG, F. A.; MOTTAGHY, F.; KOPKA, K.; APOSTOLIDIS, C.; HABERKORN, U.; MORGENSTERN, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-targeted α -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016, **57**(12), 1941–1944. ISSN 2159662X. Dostupné z DOI: 10.2967/jnumed.116.178673.
18. RASMUSSEN, G.; MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C.; MOLINET, R. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted α Therapy. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(19), 6288–6291. ISSN 0003-2700. Dostupné z DOI: 10.1021/ac0580114.
19. THIERER, L. M.; TOMSON, N. C. The actinium aqua ion: A century in the making. *ACS Central Science*. 2017, **3**(3), 153–155. ISSN 23747951. Dostupné z DOI: 10.1021/acscentsci.7b00074.
20. LIU, S.; EDWARDS, D. S. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. 1999, **99**(9), 2235–2268. ISSN 0009-2665. Dostupné z DOI: 10.1021/cr9804361.
21. FERRIER, M. G.; STEIN, B. W.; BATISTA, E. R.; BERG, J. M.; BIRNBAUM, E. R.; ENGLE, J. W.; JOHN, K. D.; KOZIMOR, S. A.; LEZAMA PACHECO, J. S.; REDMAN, L. N. Synthesis and characterization of the actinium aquo ion. *ACS Central Science*. 2017, **3**(3), 176–185. ISSN 23747951. Dostupné z DOI: 10.1021/acscentsci.6b00356.
22. SHANNON, R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica*. 1976, **32**(5), 751–767. ISSN 0567-7394. Dostupné z DOI: 10.1107/S0567739476001551.
23. BAES, C. F.; MESMER, R. S. The hydrolysis of cations. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*. 1977, **81**(2), 245–246. ISSN 0005-9021. Dostupné z DOI: 10.1002/bbpc.19770810252.
24. PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society*. 1963, **85**(22), 3533–3539. ISSN 15205126. Dostupné z DOI: 10.1021/ja00905a001.
25. DAVIS, I. A.; GLOWIENKA, K. A.; BOLL, R. A.; DEAL, K. A.; BRECHBIEL, M. W.; STABIN, M.; BOCHSLER, P. N.; MIRZADEH, S.; KENNEL, S. J. Comparison of ^{225}Ac actinium chelates : tissue distribution and radiotoxicity actinium chelates : tissue distribution and radiotoxicity. *Nuclear Medicine and Biology*. 1999, **26**(5), 581–589. ISSN 0969-8051. Dostupné z DOI: 10.1016/s0969-8051(99)00024-4.
26. SHETTY, D.; LEE, Y. S.; JEONG, J. M. ^{68}Ga -labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010, **44**(4), 233–240. ISSN 18693474. Dostupné z DOI: 10.1007/s13139-010-0056-6.
27. ŠIMEČEK, J.; HERMANN, P.; SEIDL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; MORGENSTERN, A.; WESTER, H. J.; NOTNI, J. Efficient formation of inert Bi-213 chelates by tetraphosphorus acid analogues of DOTA: Towards improved α -therapeutics. *EJNMMI Research*. 2018, **8**, 4–9. ISSN 2191219X. Dostupné z DOI: 10.1186/s13550-018-0431-3.

28. WU LING, S.; HORROCKS, W. D. Direct determination of stability constants of lanthanide ion chelates by laser-excited europium(ni) luminescence spectroscopy: Application to cyclic and acyclic; aminocarboxylate complexes. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*. 1997, (9), 1497–1502. ISSN 03009246. Dostupné z DOI: 10.1039/a700519i.
29. DEAL, K. A.; DAVIS, I. A.; MIRZADEH, S.; KENNEL, S. J.; BRECHBIEL, M. W. Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999, **42**(15), 2988–2992. ISSN 00222623. Dostupné z DOI: 10.1021/jm990141f.
30. MCDEVITT, M. R.; MA, D.; SIMON, J.; KEITH FRANK, R.; SCHEINBERG, D. A. Design and synthesis of ^{225}Ac radioimmunopharmaceuticals. *Applied Radiation and Isotopes*. 2002, **57**(6), 841–847. Dostupné z DOI: 10.1016/s0969-8043(02)00167-7.
31. TÓTH, E.; BRÜCHER, E. Stability constants of the lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N, N, N, N*-tetraacetate complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 1994, **221**(1-2), 165–167. ISSN 00201693. Dostupné z DOI: 10.1016/0020-1693(94)03964-X.
32. KODAMA, M.; KOIKE, T.; MAHATMA, A. B. Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide complexes of 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane-*N, N', N'', N''', N''''*-pentaacetic acid and 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecane-*N, N', N'', N''', N'''', N'''''*-hexaacetic acid. *Inorganic Chemistry*. 1991, **30**(6), 1270–1273. ISSN 0020-1669. Dostupné z DOI: 10.1021/ic00006a021.
33. JACQUES, V.; DESREUX, J. F. Complexation of thorium(IV) and uranium(IV) by a hexaacetic hexaaza macrocycle: kinetic and thermodynamic topomers of actinide chelates with a large cavity ligand. *Inorganic Chemistry*. 1996, **35**(25), 7205–7210. ISSN 00201669. Dostupné z DOI: 10.1021/ic9606439.
34. KENNEL, S. J.; CHAPPELL, L. L.; DADACHOVA, K.; BRECHBIEL, M. W.; LANKFORD, T. K.; DAVIS, I. A.; STABIN, M.; MIRZADEH, S. Evaluation of ^{225}Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2000, **15**(3), 235–244. ISSN 10849785. Dostupné z DOI: 10.1089/108497800414329.
35. HANCOCK, R. D. Chelate ring size and metal ion selection: The basis of selectivity for metal ions in open-chain ligands and macrocycles. *Journal of Chemical Education*. 1992, **69**(8), 615–621. ISSN 00219584. Dostupné z DOI: 10.1021/ed069p615.
36. PROCHÁZKOVÁ, S.; KUBÍČEK, V.; KOTEK, J.; VÁGNER, A.; NOTNI, J.; HERMANN, P. Lanthanide(III) complexes of monophosphinate/monophosphonate DOTA-analogues: Effects of the substituents on the formation rate and radiolabelling yield. *Dalton Transactions*. 2018, **47**(37), 13006–13015. ISSN 14779234. Dostupné z DOI: 10.1039/c8dt02608d.
37. MORGENSTERN, A.; LILLEY, L. M.; STEIN, B. W.; KOZIMOR, S. A.; BATISTA, E. R.; YANG, P. Computer-assisted design of macrocyclic chelators for actinium-225 radiotherapeutics. *Inorganic Chemistry*. 2021, **60**(2), 623–632. ISSN 1520510X. Dostupné z DOI: 10.1021/acs.inorgchem.0c02432.

38. STEIN, B. W.; MORGENSTERN, A.; BATISTA, E. R.; BIRNBAUM, E. R.; BONE, S. E.; CARY, S. K.; FERRIER, M. G.; JOHN, K. D.; PACHECO, J. L.; KOZIMOR, S. A.; MOCKO, V.; SCOTT, B. L.; YANG, P. Advancing chelation chemistry for actinium and other +3 f-elements, Am, Cm, and La. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, **141**(49), 19404–19414. ISSN 15205126. Dostupné z DOI: 10.1021/jacs.9b10354.
39. ROCA-SABIO, A.; MATO-IGLESIAS, M.; ESTEBAN-GÓMEZ, D.; TOTH, É.; DE BIAS, A.; PLATAS-IGLESIAS, C.; RODRÍGUEZ-BLAS, T. Macrocyclic receptor exhibiting unprecedented selectivity for light lanthanides. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, **131**(9), 3331–3341. ISSN 15205126. Dostupné z DOI: 10.1021/ja808534w.
40. THIELE, N. A.; WILSON, J. J. Actinium-225 for targeted α therapy: Coordination chemistry and current chelation approaches. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2018, **33**(8), 336–348. ISSN 15578852. Dostupné z DOI: 10.1089/cbr.2018.2494.
41. THIELE, N. A.; BROWN, V.; KELLY, J. M.; AMOR-COARASA, A.; JERMILOVA, U.; MACMILLAN, S. N.; NIKOLOPOULOU, A.; PONNALA, S.; RAMOGIDA, C. F.; ROBERTSON, A. K.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; SCHAFFER, P.; WILLIAMS, C.; BABICH, J. W.; RADCHENKO, V.; WILSON, J. J. An eighteen-membered macrocyclic ligand for actinium-225 targeted alpha therapy. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2017, **56**(46), 14712–14717. ISSN 15213773. Dostupné z DOI: 10.1002/anie.201709532.
42. THIELE, N. A.; MACMILLAN, S. N.; WILSON, J. J. Rapid dissolution of BaSO₄ by macropa, an 18-membered macrocycle with high affinity for Ba²⁺. *Journal of the American Chemical Society*. 2018, **140**(49), 17071–17078. ISSN 15205126. Dostupné z DOI: 10.1021/jacs.8b08704.
43. DELGADO, R.; SILVA, J. F. da. Metal complexes of cyclic tetra-azatetra-acetic acids. *Talanta*. 1982, **29**(10), 815–822. ISSN 0039-9140. Dostupné z DOI: 10.1016/0039-9140(82)80251-8.
44. REGUEIRO-FIGUEROA, M.; ESTEBAN-GÓMEZ, D. Understanding stability trends along the lanthanide series. *Chem. Eur. J.* 2014, **20**(14), 3974–3981. ISSN 0947-6539. Dostupné z DOI: 10.1002/chem.201304469.
45. KIM, W. D.; KIEFER, G. E.; MATON, F.; MCMILLAN, K.; MULLER, R. N.; DEAN SHERRY, A. Relaxometry, luminescence measurements, electrophoresis, and animal biodistribution of lanthanide(III) complexes of some polyaza macrocyclic acetates containing pyridine. *Inorganic Chemistry*. 1995, **34**(8), 2233–2243. ISSN 1520510X. Dostupné z DOI: 10.1021/ic00112a041.
46. BOTANA, L.; BASTIDA, R.; MACÍAS, A.; PÉREZ-LOURIDO, P.; VALENCIA, L. Alkali and alkaline-earth metal complexes of different nuclearities with azamacrocyclic pendant-arms ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2009, **362**(9), 3351–3356. ISSN 00201693. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ica.2009.03.015.

47. NÚÑEZ, C.; BASTIDA, R.; MACÍAS, A.; MATO-IGLESIAS, M.; PLATAS-IGLESIAS, C.; VALENCIA, L. A hexaaza macrocyclic ligand containing acetohydrazide pendants for Ln(III) complexation in aqueous solution. Solid-state and solution structures and DFT calculations. *Dalton Transactions*. 2008, (29), 3841–3850. ISSN 14779226. Dostupné z DOI: 10.1039/b800953h.
48. ABID, K; FENTON, D. E. Lanthanide complexes of some macrocyclic schiff bases derived from. *Inorganica Chimica Acta*. 1984, **95**(3), 119–125. ISSN 0020-1693. Dostupné z DOI: 10.1016/S0020-1693(00)87607-0.
49. VALENCIA, L.; MARTINEZ, J.; MACÍAS, A.; BASTIDA, R.; CARVALHO, R. A.; GERALDES, C. F. X-ray diffraction and ¹H NMR in solution: Structural determination of lanthanide complexes of a Py₂N₆Ac₄ ligand. *Inorganic Chemistry*. 2002, **41**(20), 5300–5312. ISSN 00201669. Dostupné z DOI: 10.1021/ic0257017.
50. DELGADO, R; FÉLIX, V; LIMA, L. M. P.; PRICE, D. W. Metal complexes of cyclen and cyclam derivatives useful for medical applications: a discussion based on thermodynamic stability constants and structural data. *Dalton Transactions*. 2007, **26**, 2734–2745. Dostupné z DOI: 10.1039/B704360K.
51. MIAO, L.; BELL, D.; ROTHREMEL, G. L.; BRYANT, L. H.; FITZSIMMONS, P. M.; JACKELS, S. C. Design and synthesis of an "ultrachelating" ligand based on an 18-membered ring hexaaza macrocycle. *Supramolecular Chemistry*. 1996, **6**(3-4), 365–373. ISSN 10610278. Dostupné z DOI: 10.1080/10610279608032556.
52. MicroMath Inc, Salt Lake City, U. USA. *Micromath Scientist Version 2.0*. 1995.
53. TÁBORSKÝ, P.; LUBAL, P.; HAVEL, J.; KOTEK, J.; HERMANN, P.; LUKEŠ, I. Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide(III) complexes with H₅do3ap (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic-10- (methylphosphonic acid)), a monophosphonate analogue of H₄dota. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2005, **70**(11), 1909–1942. ISSN 00100765. Dostupné z DOI: 10.1135/cccc20051909.
54. PAPADOPOULOS, E. P.; JARRAR, A.; ISSIDORIDES, C. H. Oxidations with manganese dioxide. *Journal of Organic Chemistry*. 1966, **31**(2), 615–616. ISSN 15206904. Dostupné z DOI: 10.1021/jo01340a520.
55. ROTHERMEL, L; MIAO, L.; HILL, A. L.; JACKETS, S. C. Macrocyclic ligands with 18-membered rings containing pyridine or furan groups: Preparation, protonation, and complexation by metal ions. *Inorganic Chemistry*. 1992, **31**(23), 4854–4859. ISSN 0020-1669. Dostupné z DOI: 10.1021/ic00049a025.
56. MOEDRITZER, K.; IRANI, R. R. The direct synthesis of α -aminomethylphosphonic acids. Mannich-type reactions with orthophosphorous acid. *Journal of Organic Chemistry*. 1966, **31**(5), 1603–1607. ISSN 15206904. Dostupné z DOI: 10.1021/jo01343a067.

57. FIELDS, E. K. The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids. *Journal of the American Chemical Society*. 1952, **74**(6), 1528–1531. ISSN 0002-7863. Dostupné z DOI: 10.1021/ja01126a054.
58. URBANOVSKÝ, P. Complexes of cyclen-based macrocyclic ligands with a phosphinate pendant arm. Disertační práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2020.
59. TÓTH, É; BRUCHER, E; LÁZÁR, I; TÓTH, I. Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III)-DOTA complexes. *Inorganic Chemistry*. 1994, **33**(18), 4070–4076. ISSN 0020-1669. Dostupné z DOI: 10.1021/ic00096a036.

